



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**Caracterización de las semillas de *Cinchona capuli* L.  
Andersson y *C. lancifolia* Mutis y el efecto de las  
rizobacterias promotoras del crecimiento en la  
germinación y la formación de plántulas**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en  
Botánica

**AUTOR**

José Antonio SUÁREZ TORRES

**ASESOR**

Mery Luz SUNI NINATAYPE

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Suárez, J. (2018). *Caracterización de las semillas de Cinchona capuli L. Andersson y C. lancifolia Mutis y el efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la germinación y la formación de plántulas*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN BOTÁNICA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

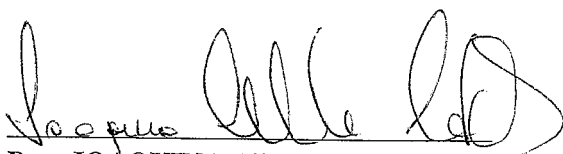
Siendo las 11:10 horas del 25 de julio de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Botánica** de **JOSÉ ANTONIO SUÁREZ TORRES**.

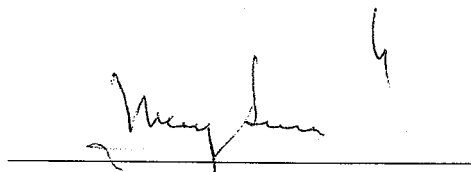
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 014-EPCB-2018, el titulando expuso su tesis: **"CARACTERIZACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Cinchona capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis Y EL EFECTO DE LAS RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO EN LA GERMINACIÓN Y LA FORMACIÓN DE PLANTULAS"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 12..., calificativo: Aprobado con mención honrosa

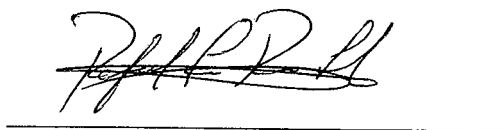
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en **Botánica** a **JOSÉ ANTONIO SUÁREZ TORRES** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 12:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 25 de julio de 2018.

  
**Dra. JOAQUINA ALBAN CASTILLO**  
(PRESIDENTA)

  
**Mg. MERY SUNI NINATAYPE**  
(ASESORA)

  
**Mg. RAFAEL LA ROSA LOLI**  
(MIEMBRO)

  
**Mg. ESTHER COX RAMOS**  
(MIEMBRO)

A mis padres y hermanos, los  
motores de mi vida, por más  
lejos que estemos siempre  
seguiré sus consejos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Estaré agradecido eternamente a mi asesora Mery Suni Ninataype quien me apoyó en todo momento en el avance de este trabajo, por los consejos, la paciencia y por el gran espíritu de investigación que siempre ha contagiado.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Fisiología Vegetal, por estar siempre dispuestos a brindarme su tiempo y sabios consejos a fin de poder culminar este proyecto.

A mis amigos del Departamento de Etnobotánica quienes me apoyaron en realizar las diferentes colectas, asimismo agradecer a la Doctora Joaquina Albán por sus enseñanzas, consejos y por darme la oportunidad de poder realizar más de un viaje para conocer mejor la situación de las especie vegetal de este trabajo.

Al laboratorio de Microbiología de Suelos de la UNALM quienes muy amablemente me brindaron el material microbiológico sin el cual no hubiera podido realizar el presente trabajo.

Asimismo agradezco al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP), y al Programa de Promoción de Tesis de Pregrado 2017 por el financiamiento económico sin el cual no hubiera podido desarrollar esta investigación.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1	Características del Genero <i>Cinchona</i> .....	3
2.2	Distribución del Género <i>Cinchona</i> .....	4
2.3	Fenología de <i>Cinchona</i> .....	5
2.4	Características de las semillas del Género <i>Cinchona</i> .....	5
2.5	Viabilidad de las Semillas .....	6
2.6	Contenido de Humedad de las semillas .....	8
2.7	Tipos de semilla en función a su tolerancia a la deshidratación. ....	8
2.8	Rizobacterias Promotoras del crecimiento .....	11
2.8.1	Azotobacter chroococcum.....	12
2.8.2	Streptomyces sp. ....	13
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
4.1	Objetivo general.....	15
4.2	Objetivos específicos .....	15
<b>5</b>	<b>MATERIALES.....</b>	<b>16</b>
5.1	Material Biológico.....	16
5.1.1	Colecta de <i>Cinchona lancifolia</i> y <i>Cinchona capuli</i> . ....	16
5.1.2	Cepas de PGPR (Azotobacter chroococcum y Streptomyces sp) .....	17
5.2	Material de Campo y de Laboratorio. ....	18
<b>6</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
6.1	Colecta de los frutos de <i>Cinchona</i> .....	20
6.2	Colecta del suelo de <i>Cinchona</i> .....	20
6.3	Selección de semillas de <i>C. lancifolia</i> y <i>C. capuli</i> .....	21
6.4	Caracterización de las semillas .....	21
6.4.1	Peso y tamaño del endospermo de la semilla .....	21
6.4.2	Evaluación de la viabilidad del embrión .....	22
6.4.3	Evaluación del contenido de humedad.....	23
6.4.4	Determinación de la tolerancia a la desecación .....	23
6.5	Efecto de la interacción de PGPR en <i>C. capuli</i> y <i>C. lancifolia</i> .....	25

6.5.1	Preparación del Sustrato: Suelo de <i>Cinchona</i> .....	26
6.5.2	Desinfección de la semilla.....	26
6.5.3	Sembrado de las semillas de <i>Cinchona</i> .....	26
6.5.4	Evaluación de la germinación en interacción con PGPR.....	27
6.5.5	Evaluación del desarrollo de la plántula .....	27
<b>7</b>	<b>RESULTADOS.</b>	
7.1	Selección de la semillas de <i>C. lancifolia</i> Mutis y <i>C. capuli</i> L. Andersson .....	29
7.2	Caracterización de la semilla .....	31
7.2.1	Peso y Tamaño de la semilla. ....	31
7.2.2	Contenido de Humedad. ....	33
7.2.3	Viabilidad de las semillas .....	34
7.2.4	Tolerancia a la desecación .....	36
7.3	Efecto de la Interacción con PGPR .....	39
7.3.1	A nivel de la germinación .....	39
7.3.2	A nivel de plántulas .....	43
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	
8.1	Colecta de frutos de <i>C. lancifolia</i> y <i>C. capuli</i> .....	49
8.2	Selección y desinfección de las semillas.....	50
8.3	Peso y tamaño de la semilla .....	50
8.4	Contenido de Humedad .....	50
8.5	Viabilidad de las semillas .....	51
8.6	Tolerancia a la desecación .....	52
8.7	Efecto de la interacción con PGPRs .....	53
8.7.1	A nivel de la germinación .....	53
8.7.2	A nivel de plántulas.....	54
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>10</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>11</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>
<b>12</b>	<b>ILUSTRACIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>13</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A. Distribución del Genero <i>Cinchona</i> . El tamaño del símbolo es proporcional al número de especies registradas, B. <i>Cinchona Capuli</i> . C. <i>Cinchona lancifolia</i> . Fuente: Andersson (1998) .....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema de la reacción de que se produce en el cloruro de tetrazolio (TPH) en presencia de enzimas deshidrogenasas. ....	7
<b>Figura 3.</b> Protocolo para determinar el comportamiento de las semillas en almacenamiento. Fuente: Hong y Ellis (1996). ....	9
<b>Figura 4.</b> Mapa de Piura señalando las provincias donde se realizó la recolección de las semillas de <i>Cinchona</i> . A.- Provincia de Ayabaca ( <i>Cinchona capuli</i> ). B.- Provincia de Huancabamba ( <i>Cinchona lancifolia</i> ). Imágenes: GoogleEarth .....	16
<b>Figura 5.</b> Variación de la precipitación (mm) en los lugares y el año de colecta. (Las estrellas indican el mes en que se realizó la colecta para cada caso). Fuente: SENAMHI. ....	17
<b>Figura 6.</b> Extracción y selección de semillas de <i>Cinchona lancifolia</i> a partir de frutos en dehiscencia en el Laboratorio de Fisiología Vegetal- Facultad de Ciencias Biológicas- UNMSM. ....	30
<b>Figura 7.</b> Semillas de <i>Cinchona lancifolia</i> , <b>A.</b> Semilla con endospermo definido y embrión notorio (flecha verde). <b>B.</b> Semilla sin endospermo definido y sin embrión aparente. ....	30
<b>Figura 8.</b> Comparación del peso de las semillas de <i>C. lancifolia</i> y <i>C. capuli</i> .....	31
<b>Figura 9.</b> Tamaño de la semilla de <i>Cinchona lancifolia</i> . A= Medida de la longitud del endospermo, B= Medida del ancho del endospermo .....	32
<b>Figura 10.</b> Semillas colectadas de <i>Cinchona lancifolia</i> (izquierda) y de <i>C. capuli</i> (derecha), las cuales difieren en coloración. ....	32
<b>Figura 11.</b> Comparación del tamaño del endospermo de <i>C. lancifolia</i> y <i>C. capuli</i> . Izquierda= comparación del largo. Derecha= comparación del ancho.....	33
<b>Figura 12.</b> Contenido de Humedad de las semillas en los 3 lotes de <i>Cinchona</i> colectadas. La humedad se determinó a la semana de colectada las semillas. ....	33
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de viabilidad de las semillas de <i>C. capuli</i> (amarillo) disminuye en el tiempo y <i>C. lancifolia</i> muestra mayor viabilidad en la colecta realizada en agosto del 2017 (azul) en comparación con la colecta de Junio del 2016 (rojo). ....	34
<b>Figura 14.</b> Embriones de <i>Cinchona lancifolia</i> extraídos de las semillas luego de la tinción realizada con Tetrazolium. Se muestra la variabilidad en la tinción de los distintos embriones .....	35

<b>Figura 15.</b> Embriones de <i>Cinchona lancifolia</i> después de la tinción Tetrazolium. El embrión A y B no presentan, en cambio el embrión C y D sí presentan viabilidad. ....	35
<b>Figura 16.</b> Variación de la humedad en las semillas de <i>C. lancifolia</i> y <i>C. capulí</i> en el tiempo a cámara de desecación a 15 % de humedad relativa y Temperatura ambiental (25°C) ....	36
<b>Figura 17.</b> Germinación en el tiempo (días) a dos condiciones de contenido de humedad de las semillas (5 y 8%) para <i>C. capuli</i> y <i>C. lancifolia</i> .....	37
<b>Figura 18.</b> Germinación de <i>Cinchona lancifolia</i> en el tiempo, a= Inicio de la germinación a los 11 días; b= Elongación de la raíz a los 16 días.....	38
<b>Figura 19.</b> Germinación según el contenido de humedad de las semillas de <i>C. capuli</i> (a=5%, b=8% contenido de humedad) y <i>C. lancifolia</i> (c= 5%,d=8% contenido de humedad) .....	38
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de germinación de <i>Cinchona lancifolia</i> y <i>C. capuli</i> en los tratamientos con <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Streptomyces</i> sp y <i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces</i> sp. a los 56 días después de sembrado. ....	40
<b>Figura 21.</b> Curso de la Germinación de <i>C. capuli</i> en los tratamientos con <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Streptomyces</i> sp., <i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces</i> sp.....	41
<b>Figura 22.</b> Curso de la Germinación de <i>C. lancifolia</i> en los tratamientos con <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Streptomyces</i> sp., <i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces</i> sp.....	41
<b>Figura 23.</b> Índice de Velocidad de germinación en los distintos tratamientos y control para <i>C. capuli</i> y <i>C. lancifolia</i> .....	42
<b>Figura 24.</b> Comparación de los porcentaje de plántulas formadas de <i>C. capuli</i> y <i>C. lancifolia</i> . En los tratamientos con PGPRs y el control. Se muestran diferencias estadísticas en <i>C. capuli</i> (tratamientos con letra común no presenta diferencias) .....	44
<b>Figura 25.</b> Comparación de la altura de las plántulas de <i>C. capuli</i> y <i>C. lancifolia</i> en los distintos tratamientos con PGPR y el control. Se muestran diferencias estadísticas en <i>C. capuli</i> (tratamientos con letra común no presenta diferencias) .....	45
<b>Figura 26.</b> Longitud de las raíces de <i>C. capuli</i> en los distintos tratamientos con PGPR y el control Se muestran diferencias estadísticas en ambas especies (tratamientos con letra común no presenta diferencias) .....	46
<b>Figura 27.</b> Plántulas de <i>C. capuli</i> . a= Tratamiento con <i>Azotobacter chroococcum</i> ; b= Tratamiento <i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces</i> sp; c= Tratamiento con <i>Streptomyces</i> sp; d= Tratamiento Control. Escala: 0.5 cm (rojo). ....	47
<b>Figura 28.</b> Comparación del peso seco de las plántulas de <i>C. capuli</i> y <i>C. lancifolia</i> en los diferentes tratamientos con PGPR y el control. (Tratamientos con letra común no presenta diferencias) .....	48

<b>Figura 29.</b> Colecta de ramas de frutos de <i>Cinchona</i> en la localidad de Cataluco, distrito y provincia de Huancabamba, departamento de Piura.....	65
<b>Figura 30.</b> Rama en fructificación de <i>Cinchona capuli</i> donde se observa frutos en formación e inmaduros.....	65
<b>Figura 31.</b> Regeneración de <i>Cinchona</i> ; Emergencia de ramas a partir de una planta quemada (a) y a partir de una planta talada (b).....	66
<b>Figura 32.</b> Frutos de <i>Cinchona</i> agrupados de acuerdo a su maduración: 1. Frutos verdes inmaduros, 2. Frutos rojizos inmaduros, 3. Frutos marrones maduros, 4. Frutos marrones oscuro, maduros y en dehiscencia .....	66
<b>Figura 33.</b> Inoculación de cepa de PGPR sobre el sustrato y semillas de <i>C. lancifolia</i> y <i>C. capui</i> .....	67
<b>Figura 34.</b> Placas Petri con semillas de <i>Cinchona</i> sembradas en sustrato suelo de <i>Cinchona</i> e inoculadas con PGPRs .....	67
<b>Figura 35.</b> <i>C. lancifolia</i> ; a= Germinación, radícula emergiendo; b= Formación de raíz; c= Placa Petri con plántulas.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Datos climáticos de las localidades de Ayabaca y Huancabamba en el mes de realizado la colecta de los frutos. Fuente: SENAMHI (Estación Piura: Ayabaca, Salala)....	17
<b>Tabla 2.</b> Caracterización del suelo de la rizósfera de <i>Cinchona lancifolia</i> colectado en Cataluco, distrito y provincia de Huancabamba, departamento de Piura en Agosto del 2017 .....	20
<b>Tabla 3.</b> Datos a completar para obtener el contenido de humedad en las semillas mediante el método de Secado al horno. ....	23
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos aplicados indicando la cepa usada y la concentración.....	25
<b>Tabla 5 .</b> Datos de Colecta de <i>Cinchona capuli</i> y <i>C. lancifolia</i> realizado en el departamento de Piura en Junio del 2016 y Agosto del 2017 .....	29
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de plántulas de <i>C. capuli</i> y <i>C. lancifolia</i> formadas en los distintos tratamientos .....	43
<b>Tabla 7.</b> Altura de plántulas y Longitud de raíces de <i>C. capuli</i> y <i>C. lancifolia</i> en los distintos tratamientos .....	47

## Resumen

El género *Cinchona* es de gran importancia para el Perú por su valor medicinal, cultural e histórico. En el norte del Perú, dentro de los bosques nublados en la Sierra de Piura se distribuyen las especies *Cinchona capuli* L. Andersson y *Cinchona lancifolia* Mutis, esta última es un nuevo registro y confundida con *Cinchona officinalis* L. por su parentesco morfológico. Estas especies vienen desapareciendo en nuestro territorio debido a la deforestación, expansión agrícola y quemas periódicas, razones por la cual su situación actual es vulnerable. Asimismo la formación de nuevos individuos a partir de semillas es muy limitada en su hábitat, debido a lo cual su distribución es reducida. El presente trabajo se realizó con el fin de **caracterizar las semillas de *Cinchona capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis y determinar el efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) en la germinación y la formación de plántulas**. Las semillas de *C. capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis fueron extraídas de frutos recolectados en el departamento de Piura en las regiones de Ayabaca y Huancabamba respectivamente, en junio del 2016 y agosto del 2017. Para la caracterización de las semillas, se evaluó el tamaño, peso, viabilidad, contenido de humedad y tolerancia a la desecación. Se obtuvo que las semillas de *C. lancifolia* presentaron mayor tamaño y peso que las semillas de *C. capuli*. Las semillas de *C. lancifolia* recolectadas en junio del 2016 mostraron 12.4% de contenido de humedad y 48.9% de viabilidad, en cambio las semillas colectadas en agosto del 2017 presentaron 9.8% de contenido de humedad y 81.1% de viabilidad, mostrando que la viabilidad y contenido de humedad depende de la madurez del fruto. Las semillas de *C. capuli* presentaron 10.6% de contenido de humedad y 88.9% de viabilidad, la cual luego de 1 año de almacenamiento se redujo a 57.8%. Esto muestra que la viabilidad de las semillas se pierde con el tiempo. Las semillas de *C. capuli* toleraron la desecación manteniendo su viabilidad a 8% y 5% de contenido de humedad y clasificándose como semillas ortodoxas, en cambio las semillas de *C. lancifolia* a 5% de contenido de humedad pierden totalmente su viabilidad, clasificándose como semillas intermedias. Los PGPRs son microorganismos benéficos del suelo, que pueden incrementar el desarrollo de las plantas directa como indirectamente, las cepas de PGPR inoculadas sobre las semillas fueron *Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces sp* ( $1 \times 10^8$  UFC c/u). La inoculación de los PGPRs tuvo efectos benéficos aumentando la longitud de la raíz y el peso seco de las plántulas en ambas especies. La cepa *Azotobacter chroococcum* incrementó en un 23.33% la formación de plántulas en *C. capuli*. Se concluye que pese a que las especies de *C. lancifolia* y *C. capuli* se encuentran en lugares próximos muestran diferente respuesta a la desecación, asimismo el efecto de las PGPRs logra incrementar el desarrollo de las plántulas.

## Abstract

The *Cinchona* genus is of great importance for Peru because of its medicinal, cultural and historical value. In northern Peru, within the cloud forests of the Sierra de Piura, species *Cinchona capuli* L. Andersson and *Cinchona lancifolia* Mutis are distributed; this latter is a new record and confused with *Cinchona officinalis* L. for its morphological similarity. These species are disappearing in our territory due to deforestation, agricultural expansion and periodic burning, reasons that their current situation is vulnerable. Likewise, formation of new individuals from seeds is very limited in their habitat, due to which their distribution is reduced. The present work aims to **characterize the seeds of *C. capuli* L. Andersson and *C. lancifolia* Mutis and to determine the effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and seedling formation.** The seeds of *C. capuli* L. Andersson and *C. lancifolia* Mutis were extracted from fruits collected in the department of Piura in the regions of Ayabaca and Huancabamba respectively, in June 2016 and August 2017. For the characterization of seeds, the size, weight, viability, moisture content and tolerance to desiccation. It was obtained that seeds of *C. lancifolia* had greater size and weight than seeds of *C. capuli*. Seeds of *C. lancifolia* collected in June 2016 showed 12.4% moisture content and 48.9% viability, while seeds collected in August 2017 showed 9.8% moisture content and 81.1% viability, showing that viability and moisture content depends on the maturity of fruit. Seeds of *C. capuli* presented 10.6% moisture content and 88.9% viability, which after 1 year of storage was reduced to 57.8%. This shows that viability of seeds is lost over time. Seeds of *C. capuli* tolerated drying, maintaining its viability at 8% and 5% moisture content and classified as orthodox seeds, whereas seeds of *C. lancifolia* at 5% moisture content lose their viability totally, classifying themselves as intermediate seeds. The PGPRs are beneficial microorganisms of the soil, which can increase the development of plants directly or indirectly, the inoculated PGPR strains on seeds were *Azotobacter chroococcum* and *Streptomyces* sp ( $1 \times 10^8$  UFC c/u). The inoculation of PGPRs had beneficial effects increasing length of root and dry weight of seedlings in both species. *Azotobacter chroococcum* increased the formation of seedlings in *C. capuli* by 23.33%. It is concluded that although species of *C. lancifolia* and *C. capuli* are in close places show different response to desiccation, also the effect of the PGPRs manages to increase the development of seedlings

## 1 INTRODUCCIÓN

Las especies de *Cinchona* en el Perú son conocidas comúnmente como “árbol de la quina” o “cascarilla” y se distribuyen en la región andina sudamericana en zonas muy limitadas; se caracterizan por presentar la corteza amarga y ser reconocidas mundialmente como remedio contra la malaria y otras infecciones (Stell, 1982), debido a lo cual se extrajo irracionalmente durante muchos años.

Actualmente su hábitat se ha convertido en uno de los ecosistemas más amenazados por el hombre debido a la expansión agrícola, lo cual ha causado una disminución de estas especies, a tal punto que no es fácil encontrar poblaciones de cascarilla, únicamente están ubicadas en lugares apartados y pequeños relictos boscosos. Asimismo se observa que en condiciones naturales las semillas presentan baja tasa de germinación y poca sobrevivencia de plántulas (Buddenhagen, et al. 2004). Esto ha conllevado a que muchas especies de *Cinchonas* sean vulnerables y consideradas como prioritarias en la conservación.

Estudios enfocados en las semillas de *Cinchona* demuestran que estas presentan una baja viabilidad, la cual parece estar determinada drásticamente por el tiempo de almacenamiento, contenido de humedad y estadio de madurez (Mejía, 2014). Por ello, la formación de plántulas a partir de semillas ocurre dificultosamente en su hábitat natural. También se atribuye la baja sobrevivencia a problemas de aclimatación, tipo de sustrato y presencia de patógenos (Apolo, 2012).

Otros trabajos se han enfocado en la propagación de especies de *Cinchona*, con miras a la conservación y reintroducción en su hábitat, estos señalan que la propagación vegetativa a partir de esquejes y acodos no es viable (Conde, 2016). Asimismo la propagación in vitro, con acción hormonal y con suplementos de minerales da efectos

positivos solo a nivel de laboratorio y a concentraciones determinadas (Campos, 2014; Jiménez & Ramiro, 2016).

Estos precedentes resaltan la necesidad de conocer las características que presentan las semillas de *Cinchona* y los mecanismos que puedan aumentar su viabilidad y el crecimiento de las plántulas, como una posible herramienta para la conservación de estas especies a mediano y largo plazo.

Distintos trabajos en los últimos años han demostrado un aumento considerable a nivel de la germinación, crecimiento y estabilidad de las plántulas cuando interaccionan con Bacterias PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria). Los PGPRs son bacterias que colonizan la rizósfera y afectan el crecimiento de las plantas de manera directa: produciendo hormonas y facilitando la absorción de ciertos nutrientes o indirectamente: disminuyendo los efectos nocivos de uno o más organismos fitopatógenos (Glick, 1995).

Por las razones expuestas en el presente trabajo se describe las semillas de *Cinchona capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis evaluando las condiciones de viabilidad, humedad y tolerancia a la desecación evaluando asimismo la interacción de PGPR a nivel de la germinación y el crecimiento de las plántulas.



## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Características del Genero *Cinchona*

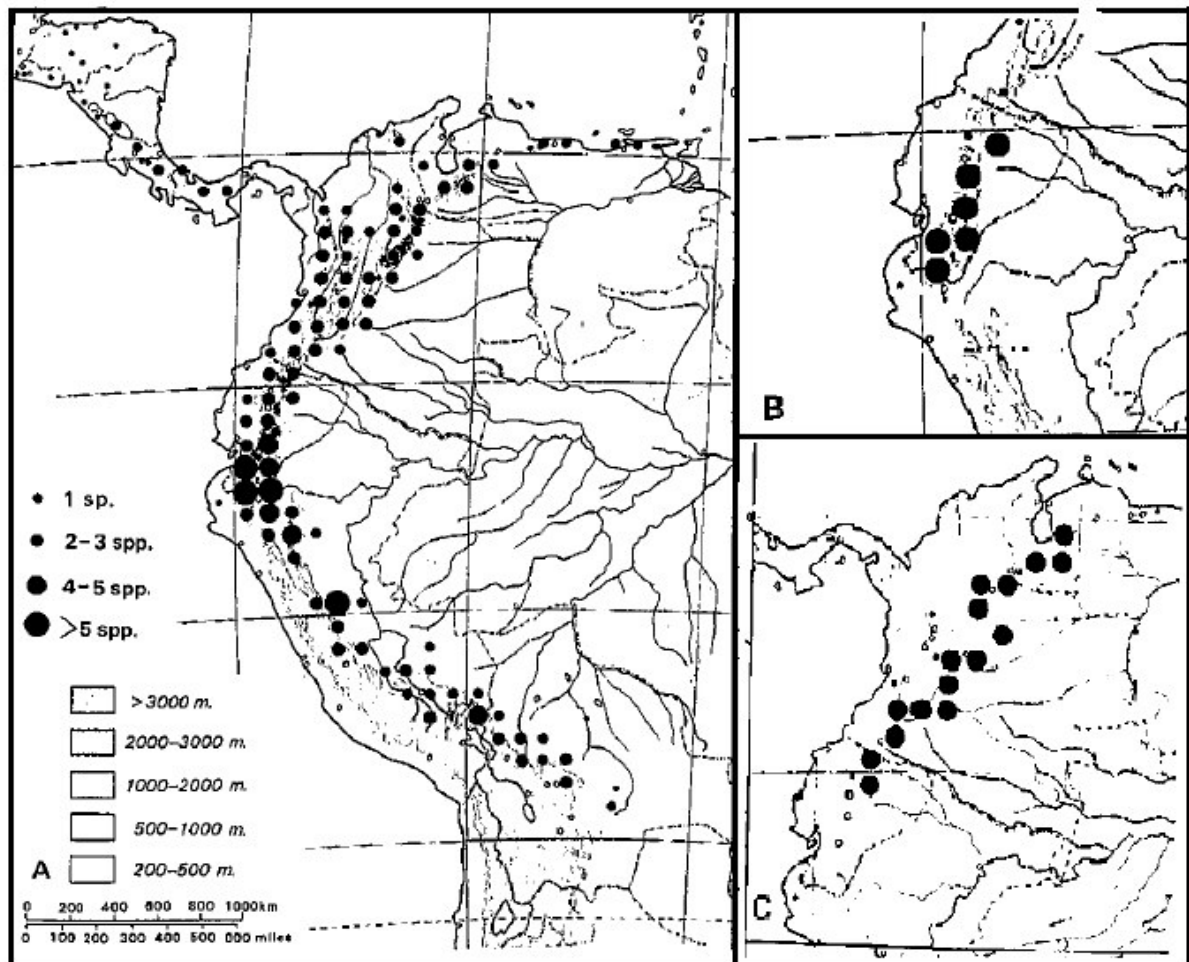
El género *Cinchona* pertenece a la tribu Cinchoneae de la subfamilia Cinchonoideae, familia Rubiaceae y clase Magnoliópsida. Fue recolectado por primera vez por Ch. Condamine en 1738 basándose en *C. pubescens* Vahl., mientras que Linneo en 1753 describió el género basándose en *C. officinalis* L.(Andersson, 1998). De las 24 especies que conforman este género, 19 se encuentran distribuidas en el Perú, y de las cuales 2 son especies consideradas endémicas (Albán, 2013).

Las *Cinchonas* suelen ser arbustos o árboles medianos a grandes; glabros o variadamente pubescentes; el tallo algunas veces se descascara en forma de láminas, presenta una corteza caracterizada por su sabor amargo, al cortarlo generalmente es rojiza o pálida. Presenta estipulas interpeciolares, usualmente grandes, diferentes, libres, no fusionadas alrededor del peciolo, caducas o persistentes, triangular a oblonga liguladas u obovadas algunas veces reflexa, unidas cara a cara en la yema glandular en la base. Corola hipocraterimorfa, con textura gruesa (de paredes robustos); color blanco, crema, rosada o rojo, o púrpura. Tubo externamente pulberulento a pubescente o glabro, internamente glabro o levemente hirsuto o viloso, con o sin un anillo de tricomas en el interior, longitud del tubo más largo que la longitud de los lóbulos. Lóbulos 5, raras veces 4 o 6, triangulares, valvados, con extensiones villosas (o papilares) en el interior de las márgenes del limbo. Fruto cápsula septicida, ovoidea, oblonga o cilíndrica, con dehiscencia acropétala o basipétala; posteriormente las valvas se desprenden en el ápice. Valvas de paredes delgadas y levemente leñosas(Albán, 2013)..

Las plantas de *Cinchona* son conocidas por producir un metabolito conocido como “quinina”, que ha demostrado tener propiedades antimaláricas para combatir fiebres especialmente el paludismo; además; se le atribuye su uso para estimular el apetito, tonificar el organismo, para casos de estrés psíquico y físico, también para estimular el crecimiento del cabello y evitar su caída (Garmendia, 2005).

## 2.2 Distribución del Género *Cinchona*

Las especies del genero *Cinchona* están distribuidas esencialmente en la región andina de Sudamérica, en los bosques pre-montanos y montanos desde Bolivia central hasta el norte de Colombia y Venezuela. Este género presenta un centro de diversidad en la región de Huancabamba en el Norte del Perú (Figura 1A). Los registros para *C. capuli* lo distribuyen entre los Andes del sur de Ecuador y el norte de Perú entre los 1000 a 2600 msnm (Figura 1B) en cambio *C. lancifolia* está registrada en la cordillera oriental de Colombia, Venezuela y Ecuador entre los 1680 a 2900 msnm (Figura 1C) (Andersson, 1998), esta especie se ha encontrado actualmente en la región norte del Perú.



**Figura 1. A.** Distribución del Genero *Cinchona*. El tamaño del símbolo es proporcional al número de especies registradas, **B.** *Cinchona Capuli*. **C.** *Cinchona lancifolia*.

Fuente: Andersson (1998)

### **2.3 Fenología de *Cinchona*.**

En la especie *C. officinalis* las plantas pueden formar flores a partir de los 4 años de edad y presentan como agente polinizador a las aves. La floración se inicia por lo general en febrero y declina en mayo, la fructificación se inicia en abril y declina en junio; la recolección de semillas se puede realizar en los meses de mayo y junio (Jerez, 2017). Se ha podido observar que la floración y fructificación puede variar de acuerdo a su distribución. Todas las semillas de *Cinchona* presentan ala por lo que su principal método de dispersión es por anemofilia (Nair, 1980). La germinación de *C. officinalis* en su ambiente natural es muy rara y suele demorar entre 2 a 3 semanas, asimismo el crecimiento de las plántulas suele ser muy lento llegando en algunos casos a 2 cm por año (Jerez, 2017).

En su hábitat se reproducen naturalmente de manera vegetativa por regeneración a partir de tallos (Apolo, 2012)(Figura 31). Actualmente las poblaciones de *Cinchona* son pequeñas, encontrándose solo en lugares donde se dan condiciones específicas para la germinación y el desarrollo de las plántulas. Las poblaciones naturales de esta especie se están reduciendo principalmente por prácticas de quema en agricultura migratoria y explotación de la madera (Mejía, Manzano, et al., 2012).

### **2.4 Características de las semillas del Género *Cinchona***

Las semillas son planas convexas, presentan un hilo localizado aproximadamente al centro del plano de la semilla (Andersson, 1998). Las semillas presentan ala irregularmente dentada formada a partir de la exotesta. Las semillas son pequeñas llegando a medir en el caso de *C. officinalis* L. entre 5.1-5.3 mm de largo y 2.3- 2.9 mm de ancho, incluida el ala; asimismo el peso de cada semilla es ínfimo, por lo cual se necesita pesarlas en grupo para que sea significativo (Mejía, 2014).

Las semillas maduras presentan un endospermo y embrión bien diferenciados, en algunos casos el endospermo es oleoso, en cuanto al embrión presenta los cotiledones y la radícula casi del mismo tamaño (Andersson, 1998). El tamaño reducido del endospermo aporta poco al crecimiento de la nueva planta y esta depende muy pronto de los recursos disponibles en su medio, por lo que su riesgo de morir es muy alto (Moreno, 1984).

Las semillas son diminutas y se dispersan de inmediato al abrirse los frutos, por lo cual es conveniente cosechar estos últimos cuando aún se encuentran en el árbol. En *C. officinalis* las semillas pierden rápidamente su viabilidad y deben utilizarse de inmediato luego de obtenidas (Nair 1980).

A menudo, las semillas recientemente colectadas tienen un contenido de humedad alto (10-20%) y son susceptibles de contaminarse con hongos y bacterias. Los frutos y las semillas húmedos tienen tasas altas de respiración, y si el oxígeno se reduce debido a una aireación inadecuada, se fermentan. Tanto la respiración como la fermentación crean calor, lo cual deteriora el material colectado. Es necesario emplear métodos manuales para limpiar y extraer las semillas con el fin de conservar la viabilidad, asimismo los frutos maduros se abren y liberan las semillas mientras se secan (Rao et al 2007).

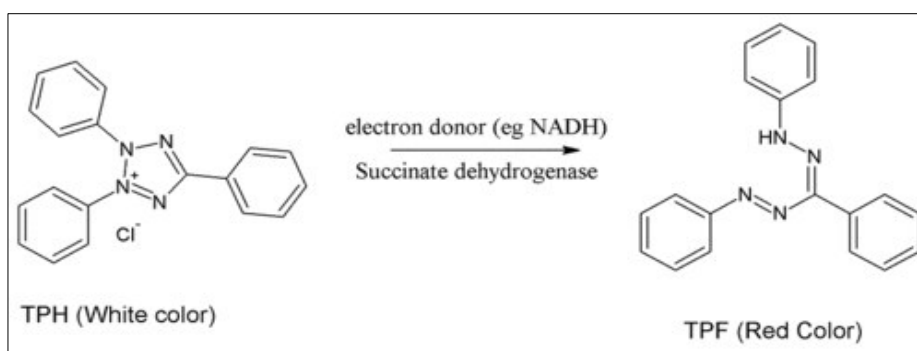
## **2.5 Viabilidad de las Semillas**

La viabilidad de un lote de semillas, hace referencia a su capacidad de germinar y de originar plántulas normales en condiciones ambientales favorables. Por el contrario el concepto de no viable serían aquellas semillas con el embrión no desarrollado o muerto y que no logran germinar o que pudieran dar plántulas anormales.

Para evaluar y cuantificar la viabilidad de las semillas se pueden realizar diferentes tipos de test, entre los que destacan: ensayos de germinación, test del Tetrazolium (tinción de tejidos) y radiografía con rayos X (García & Villamil, 2001). La prueba de tinción de tejidos

han sido ampliamente utilizadas debido a que clasifican apropiadamente los tejidos vivos de los muertos, en este sentido, la prueba de tetrazolio, por su confiabilidad y sencillez es la más empleada (Elias& Garay,2004).

El método de tetrazolio para determinar la viabilidad de las semillas fue propuesto por el científico alemán Lakón durante el siglo XIX (1939-1958) quien descubrió que todos los tejidos vivos, que respiran, son capaces de reducir el químico incoloro 2, 3, 5 cloruro trifeniltetrazolio (TPH) en un color rojo mediante reacciones de transferencia de hidrógenos a 1, 3, 5 trifenilformazan (TPF) catalizada por enzimas deshidrogenasas, tiñendo a los tejidos vivos de color rojo (Figura 2). Por lo tanto, las partes vivas se una semilla viable se tiñen de color rojo cuando se incuban en la solución de este químico. La reacción se da como sigue:



**Figura 2.** Esquema de la reacción de que se produce en el cloruro de tetrazolio (TPH) en presencia de enzimas deshidrogenasas.

Esta prueba es destructiva debido a que es necesario la extracción del embrión para hacer estudios respectivos, sin embargo es una técnica rápida que puede ser utilizada para el control de calidad de las semillas (Akbari&Salehi, 2008). Así mismo esta técnica al evaluar solo si los tejidos de las semillas están vivos, no determina la dormancia. El procedimiento para realizar esta prueba se divide en 4 fases:1) Hidratación de las semillas, la cual se emplea para activar a las enzimas hidrogenasas. 2) Incisión de las semillas, que permitirá el ingreso del tetrazolio al embrión de las semillas. 3) Incubación, que brinda al tetrazolio el tiempo necesario para reaccionar con los tejidos vivos y

colorearlos. 4) Evaluación, en donde se realiza la interpretación de los resultados (Elias & Garay, 2004).

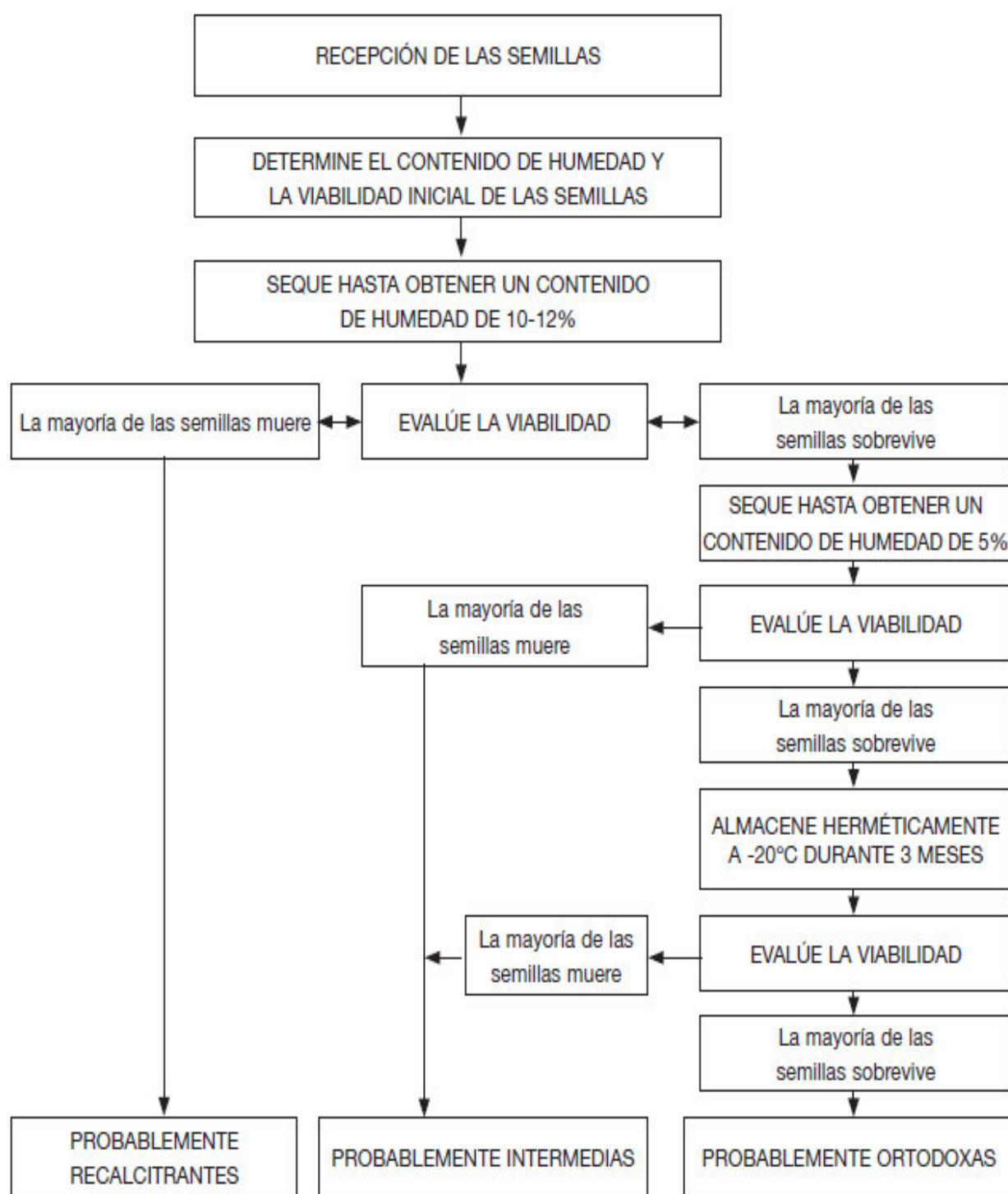
## **2.6 Contenido de Humedad de las semillas**

El agua está presente tanto en forma libre como combinada con los compuestos químicos de las células, como carbohidratos y proteínas. El contenido de humedad de las semillas es la cantidad de agua que hay en una semilla. El Contenido de humedad es el factor más importante para determinar la velocidad a la cual las semillas se deterioran, y tiene un impacto considerable en la longevidad de las semillas en almacenamiento en un banco de germoplasma. Incluso pequeños cambios con el contenido de humedad tienen un gran efecto en la viabilidad de las semillas.

**Método de secado en horno:** Mediante este método se elimina el agua de las semillas por la acción del calor, en condiciones controladas. Este método destruye a la semilla y solo debe realizarse cuando sea imprescindible. Se recomienda hacer una determinación precisa con este método después del secado para determinar el contenido de humedad inicial de las semillas almacenadas. (ISTA, 2005)

## **2.7 Tipos de semilla en función a su tolerancia a la deshidratación.**

Según la respuesta a la desecación, las semillas se pueden clasificar en tolerantes a la desecación (ortodoxas), sensibles a dicho proceso (recalcitrantes) y del tipo intermedio (Figura 3). Las semillas recalcitrantes no soportan pérdidas de agua sin disminuir su viabilidad (Pritchard & Manger, 1998; Pammenter & Berjack, 1999), mientras que las semillas ortodoxas, pueden ser secadas para disminuirles su contenido de humedad sin causarles daño. Debido a esta propiedad la longevidad de las semillas ortodoxas se incrementa por la reducción de su contenido de humedad (Gold & Hay, 2008) y pueden almacenarse en estado seco, por periodos predecibles y bajo condiciones específicas en bancos de semillas para su conservación *ex situ* (Roberts, 1972).



**Figura 3.** Protocolo para determinar el comportamiento de las semillas en almacenamiento. Fuente: Hong y Ellis (1996).

Para poder tolerar la desecación, las semillas utilizan muchos mecanismos intracelulares, como la reducción del grado de vacuolización, manejo de la cantidad y naturaleza de reservas insolubles acumuladas, la integridad del citoesqueleto, disminución de áreas de superficies de membrana, "apagado" del metabolismo (reducción drástica de la tasa metabólica), presencia y operación eficiente de sistemas antioxidantes, acumulación y función de las moléculas protectoras, incluyendo proteínas embriogénicas tardías acumulantes/ abundantes (LEA's), sacarosa y ciertos oligosacáridos o ciclitos de galactosil, despliegue de ciertas moléculas anfipáticas, producción de una capa efectiva periférica de oleosina alrededor de los cuerpos lipídicos, la presencia y operación de mecanismos de reparación durante la rehidratación y otros (Berjak & Pammenter, 2007).

Con respecto a la adquisición de tolerancia a la deshidratación en semillas ortodoxas en desarrollo ha sido relacionado con unas proteínas denominadas LEA (late embryogenic abundant) que incluyen una serie de proteínas hidrofílicas resistentes al calor, ricas en aminoácidos no cargados e hidroxilados y con dominios muy conservados (Azcon&Talon, 2008). Su síntesis parece estar asociado con niveles altos de ABA que alcanzan su máximo nivel durante las etapas más tardías del desarrollo de la semilla (Kermode,1995).

Las características de LEA's y las condiciones bajo las cuales aparecen, han llevado a sugerir que funcionan como protectoras quizás estabilizando las estructuras subcelulares en la condición de deshidratación (Close, 1997; Dure,1993) como por ejemplo uniéndose a la membrana y a las proteínas celulares para preservarlas del estrés que provoca la pérdida de agua (Azcon & Talon, 2008). Lo que sugiere que la semillas ortodoxas son tolerantes a la desecación debido a que durante su desarrollo han pasado por un proceso de desecación natural relacionado con la maduración en cambio para el tipo de semillas recalcitrantes, no habrían pasado por un proceso de desecación durante su desarrollo, así mismo, se tienen diferencias morfológicas entre semillas ortodoxas y recalcitrantes, mientras que las primeras presentan epispermios más gruesos, las segundas poseen



epispermos más delgados, lo cual disminuiría la protección al ala de la semilla ante un secado natural o artificial (Dawis et al., 2006; Hong & Ellis, 1996).

## **2.8 Rizobacterias Promotoras del crecimiento**

En el suelo conviven distintos géneros bacterianos en interacción con las raíces. Dicha interacción puede ser benéfica, perjudicial o neutral. Aquellas bacterias que colonizan la rizósfera y establecen un sinergismo con las raíces impactando positivamente sobre el crecimiento de las plantas mediante cualquier mecanismo, se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés Plant growth promoting rhizobacteria) (Glick, 1995).

Los PGPRs ha mostrado efectos positivos en plantas sobre parámetros tales como tasa de germinación, tolerancia a la sequía, peso de raíces, rendimiento y crecimiento de la planta (Kloepper et al., 2004). Además de mejorar el crecimiento de las plantas, las PGPR están directamente involucradas en una mayor absorción de nitrógeno, síntesis de fitohormonas (AIA, Ácido Indolacético), solubilización de minerales como el fósforo y producción de sideróforos que quelan el hierro y lo hacen disponible para la raíz de la planta (Lalande et al. 1989; Glick, 1995).

Otro beneficio importante de PGPR es producir compuestos antibacterianos que son efectivos contra ciertos patógenos y plagas de plantas (Dey et al., 2004; Herman et al., 2008; Minorsky, 2008). Además, PGPR media el control biológico indirectamente al provocar resistencia sistémica inducida contra varias enfermedades de las plantas (Jetyanon y Kloepper, 2002). También se ha encontrado que la aplicación de algunas cepas de PGPRs a semillas o plántulas conduce a un estado de resistencia sistémica inducida (SIR) en la planta tratada (Kloepper et al., 1999). Asimismo PGPRs aislados a nivel de las raíces de una especie pueden colonizar las raíces de distantes especies y

aumentar la altura, el número de flores, el número y peso de frutos (Minorsky, 2008). Dentro de este grupo de bacterias denominadas PGPR se encuentran los géneros: Alcalígenes, Arthrobacter, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Serratia, Azotobacter, Azospirillum, Clostridium, Pseudomonas, Bacillus y Actinomicetos (Kloepper et al., 1999; Basham & Levanony, 1990; Okon & Lavandera, 1994; Maier et al., 2004).

Las PGPR son herramientas prometedoras en el mejoramiento vegetal y su efecto depende de la concentración y tipo de cepa a utilizar, así como del sustrato en la que este interaccionando (Doubou et al., 2001).

### **2.8.1 *Azotobacter chroococcum***

Las bacterias del género *Azotobacter*, están presentes en grandes densidades en el agroecosistema y se asocian al sistema radical de algunas especies vegetales ocasionando una aceleración del desarrollo y un aumento del rendimiento en los cultivos, debido fundamentalmente a su capacidad de sintetizar sustancias biológicamente activas como auxinas, citoquininas, giberelinas, aminoácidos y vitaminas (Vancura, 1961; Brown & Walker, 1970; Dibut, 1988; Martínez et al., 1997). Distintos estudios han demostrado que *Azotobacter chroococcum* como bioinoculante en el suelo mejora el crecimiento de las plantas por mecanismos como: la fijación de nitrógeno, producción de sustancias antifúngicas (Lakshminarayana et al., 1992), sideróforos (Suneja et al., 1994) y solubilización de fosfato (Kumar et al., 2001).

Este género crece a un pH mínimo de 4,6 – 6,0 y a un máximo de 8,5, con un pH ideal de 7,0-7,5. La mayoría de aislamientos de *Azotobacter* provienen del suelo, pero existen también algunas especies aisladas de ambientes acuáticos. Las colonias de *Azotobacter* son viscosas, convexas, lisas o arrugadas y poseen pequeñas inclusiones granulares, y el color depende del medio de cultivo, pueden llegar a medir de 2 – 6 mm de diámetro en 5 días a una temperatura de 28 a 30° C.

### **2.8.2 *Streptomyces* sp.**

*Streptomyces* es el género de bacterias más grande de la familia Actinomycetes, este género tienen un papel importante en la ecología de suelos, por su propiedad de degradar sustratos recalcitrantes tales como la quitina y lignina. Los actinomycetes están presentes en suelos alcalinos y neutros, el pH óptimo de estas bacterias se encuentra entre 6.0 y 8.0 y a un pH por debajo de 5.0 estas bacterias están ausentes, no obstante, en investigaciones recientes se ha reportado especies de actinomicetos capaces de tolerar ambientes ácidos (pH=2) (Matsubara, 2013) asimismo son consideradas bacterias mesófilas es decir registran un óptimo crecimiento entre 25°C y 30°C.

Los *Streptomyces* se caracterizan por la producción de antibióticos y presentar actividad antagonista contra hongos fitopatógenos, sin ocasionar efectos tóxicos a las plantas (Rothrock&Gottlieb, 1981). Es considerado también fijador de nitrógeno y productor de sideróforos, así como tener potencial para la inducción de raíces (Tokala et al., 2002). Así mismo se señala que *Streptomyces* produce ácido indol-3-acético (IAA) el cual promueve el crecimiento de las plantas (Aldesuquy et al., 1998),

### **3 HIPÓTESIS**

La germinación y el crecimiento de plántulas de las especies *Cinchona capuli* L.

Andersson y *Cinchona lancifolia* Mutis se incrementan por la acción directa o indirecta de Rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR)

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general.**

Caracterizar las semillas de *Cinchona capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis y el efecto de las Rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) en la germinación y el desarrollo de sus plántulas.

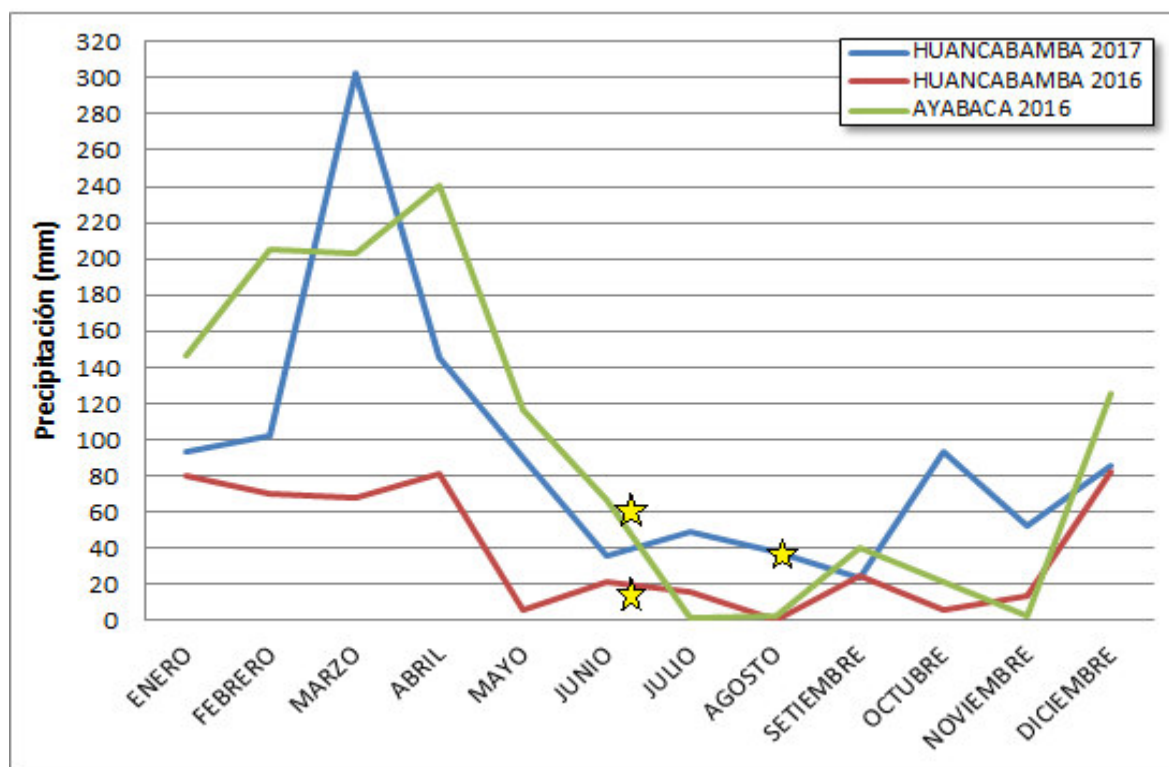
### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar las características de las semillas de *Cinchona capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis en relación al tamaño, peso, contenido de humedad, viabilidad y su respuesta a la desecación (carácter ortodoxo, intermedio o recalcitrante).
- Evaluar las respuestas de 2 PGPRs (*Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces sp.*) y su combinación, en la germinación y el crecimiento de las plántulas de *C. capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis.



**Tabla 1.** Datos climáticos de las localidades de Ayabaca y Huancabamba en el mes de realizado la colecta de los frutos. Fuente: SENAMHI (Estación Piura: Ayabaca, Salala)

Provincia	AÑO	MES	T° Max.(°C)	T° Min.(°C)	Precipitación (mm) anual	Especie encontrada
AYABACA	2016	JUNIO	18.6	9.5	1171.9	<i>C. capuli</i>
HUANCABAMBA	2016	JUNIO	23.6	13.3	468.9	<i>C. lancifolia</i>
	2017	AGOSTO	26.1	12.4	1110.3	<i>C. lancifolia</i>



**Figura 5.** Variación de la precipitación (mm) en los lugares y el año de colecta. (Las estrellas indican el mes en que se realizó la colecta para cada caso). Fuente: SENAMHI

### 5.1.2 Cepas de PGPR (*Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces* sp)

Las cepas de *Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces* sp. fueron brindadas en medio de cultivo líquido por el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, estas cepas se obtuvieron de la rizósfera de suelo de *Cinchona* y clasificadas como PGPR por la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato. La identificación de estas cepas fue realizada por el laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

## **5.2 Material de Campo y de Laboratorio.**

### Material de campo

- Tijera telescópica
- Tijera de podar
- Pala
- Bolsas de papel
- Bolsas Ziploc
- Bolsas plásticas
- Costales de rafia
- Libreta de campo

### Reactivos

- Tetrazolium rojo (2,3,5 trifeniltetrazolio)
- Hipoclorito de sodio al 4%
- Alcohol etílico de 96°
- Sílica gel
- Agua destilada

### Equipos

- Balanza analítica (precisión 0,0001g)
- Estereoscopio
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Cámara de crecimiento
- Estufa eléctrica
- Cámara fotográfica
- Computadora



#### Material de Laboratorio

- Placas Petri
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Pinzas
- Bisturí (mango y hojas)
- Sustrato (musgo)
- Algodón
- Cámara de desecación

#### Material de escritorio

- Cuaderno de apuntes
- Hojas milimetradas
- Plumón marcador
- Regla milimetrada

## 6 MÉTODOS

### 6.1 Colecta de los frutos de *Cinchona*

Las colectas fueron realizadas en el marco del proyecto FLORAM (Estudio de las poblaciones de flora amenaza). La recolección se dio a partir de ramas fructíferas de *C. lancifolia* y *C. capulí*, las cuales fueron separadas de acuerdo a su madurez y dehiscencia, y colocadas en bolsas de papel, se rotularon indicando la fecha y lugar de colecta así como su muestra Botánica. Todas las bolsas de papel con los frutos recolectados fueron transportadas en costales de rafia hasta el laboratorio de Fisiología vegetal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos donde se mantuvieron en cámara de desecación con sílica gel para evitar la contaminación por hongos. Las especies de *Cinchona* mencionadas fueron determinadas por la Dra. Joaquina Albán, especialista en la familia Rubiácea, siguiendo el sistema de clasificación APG IV 2016 (Angiosperms Phylogeny Group).

### 6.2 Colecta del suelo de *Cinchona*

Con la finalidad de mantener las plántulas en el suelo de su hábitat natural, se extrajo 3 kg aproximadamente de suelo a 20 cm de profundidad de la rizósfera de *C. lancifolia* de la localidad de Cataluco, provincia de Huancabamba, departamento de Piura en Agosto del 2017. Se tomaron las muestras de suelo de árboles de *Cinchona* de más de 8 metros de altura y fue recolectado en bolsas Ziploc. El suelo fue caracterizado en el laboratorio de Análisis de suelos, de la facultad de Agronomía, Departamento de Suelos de la Universidad Nacional Agraria (tabla 2) (Anexo 15).

**Tabla 2.** Caracterización del suelo de la rizósfera de *Cinchona lancifolia* colectado en Cataluco, provincia de Huancabamba, departamento de Piura en Agosto del 2017

SUSTRATO	PH (1:1)	C.E dS/m	M.O %	Macro elementos		Clase Textural
				K (ppm)	P (ppm)	
Suelo de la Rizósfera <i>Cinchona</i>	4.48	0.31	10.59	179	2.5	FR.A.
C.E= Conductividad eléctrica; M.O.= Materia orgánica; FR.A.= Franco arenoso						

### **6.3 Selección de semillas de *C. lancifolia* y *C. capuli***

Las semillas de *C. lancifolia* y *C. capuli* se obtuvieron solo de frutos maduros en dehiscencia, no se utilizaron las semillas de frutos cerrados porque no habían completado su maduración. Se procedió a eliminar las impurezas, con el apoyo de una lupa manual, seguidamente se seleccionaron las mejores semillas considerando características fenotípicas tales como: forma, tamaño, color, madurez fisiológica y buenas condiciones fitosanitarias, sobre todo se seleccionaron las semillas con el endospermo visible y definido, las semillas infectadas por hongos o insectos fueron descartadas. Las semillas seleccionadas fueron colocadas temporalmente en sobres de aluminio rotulados y cerrados herméticamente, y luego almacenadas a 4°C en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Para contar con suficientes semillas de *C. lancifolia* se trabajó con 2 colectas (junio 2016 y agosto 2017) ambas se realizaron en la provincia de Huancabamba, para *C. capuli* solo se utilizó la colecta de agosto del 2016.

### **6.4 Caracterización de las semillas**

#### **6.4.1 Peso y tamaño del endospermo de la semilla**

Para la determinación del peso de las semillas se tomaron 7muestras de 100 semillas cada una y fueron pesadas en una balanza analítica. Para determinar el tamaño de las semillas se midieron su largo y ancho sin considerar su ala, en 100 semillas. Esta medición en milímetros se realizó en un estereoscopio con el programa "Image Focus Alpha". Estos procedimientos se aplicaron para ambas especies estudiadas.

#### 6.4.2 Evaluación de la viabilidad del embrión

Las evaluaciones de la viabilidad de las semillas se realizaron mediante la Prueba de tinción con Tetrazolium (TZ). Se utilizaron 90 semillas de cada lote (3 repeticiones de 30 semillas cada uno), las cuales se embebieron en agua destilada por 24 horas para activar al embrión, luego se realizó un corte a nivel del endospermo y se sumergió en 1ml de colorante Tetrazolium (TZ) en tubos Eppendorf, cada tubo se cubrió con papel aluminio y se mantuvo en oscuridad por 24 horas; pasado el tiempo se enjuagó con agua destilada para remover todo sobrante del colorante, se colocaron sobre una placa y bajo el estereoscopio se extrajo el embrión. Se evaluó la coloración del embrión, se clasificó como viable a aquella que presentó el embrión teñido de rojo o rosado y como no viable aquellos con el embrión incoloro o parcialmente (Deulocheet *al*, 1971) (Figura 15).

Para preparar 1 litro de solución neutralizada de cloruro de tetrazolium al 1% se necesitó:

- a. Disolver 3.361 g de potasio dihidrogeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en 400 ml de agua destilada.
- b. Disolver 7.126 g de disodio hidrogeno fosfato ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 600 ml de agua destilada.
- c. Mezclar las dos soluciones para preparar la solución neutralizada.
- d. Disolver 10 g de cloruro de 2,3, 5- Trifenil-tetrazolio en 1 litro de la solución neutralizada.

La solución de Tetrazolium debe estar a un pH entre 6 y 8 para lograr los mejores resultados y ser almacenadas en condiciones de oscuridad y frio, durante periodos cortos (ISTA, 2005).

El análisis de la viabilidad se realizó en dos momentos, en julio del 2016 y agosto del 2017. Para la viabilidad de las semillas de *C. capuli* se evaluaron en ambas fechas, en cambio para *C. lancifolia* colectada en el 2016 y en el 2017 solo se hizo un análisis por cada colecta, debido a la poca cantidad de semillas obtenidas.

### 6.4.3 Evaluación del contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó mediante el secado a 130 °C en horno durante dos horas (ISTA, 2005), la humedad se determinó a las 2 semanas del ingreso del material, se utilizaron 3 repeticiones de 100 semillas cada una, cada repetición fue colocada en placa de metal para su secado al horno. Se determinó el peso antes y después del secado. Después del secado se enfrió durante 45 minutos en cámara de desecación. El Contenido de humedad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido humedad (\%)} = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$$

Dónde:

P1: Peso de la placa de metal.

P2: Peso de la placa de metal con la muestra antes del secado.

P3: Peso de la placa de metal con la muestra después del secado.

**Tabla 3.** Datos a completar para obtener el contenido de humedad en las semillas mediante el método de Secado al horno.

Lote	Especie	Fecha de análisis	PESO				humedad
			repetición	P1	P2	P3	

### 6.4.4 Determinación de la tolerancia a la desecación

Se evaluó la tolerancia a la desecación de las semillas para determinar el carácter ortodoxo, intermedio o recalcitrante de estas. Para esto se evaluó el porcentaje de

germinación a dos condiciones de humedad en la semilla, 5% y 8%. La germinación se realizó luego de 1 mes de estar almacenadas a 4°C en sobres de aluminio herméticamente cerrados. Esta determinación se realizó para ambas especies, en el caso de *C. lancifolia* se usaron las semillas recolectadas en el 2016.

### **Reducción de la Humedad.**

Para llevar a las semillas al contenido de humedad de 5% y 8% se colocaron a estas en una cámara de desecación con sílica gel a 15% de humedad relativa y a temperatura ambiental de 25°C, cada 3 horas se retiraban 200 semillas para determinar el contenido humedad mediante el método planteado en la sección 6.4.3; para ello se utilizaron 2 repeticiones de 100 semillas. Con los datos se formó una gráfica en donde muestra la disminución del contenido de humedad de la semilla en función al tiempo de almacenamiento a humedad relativa de 15%. De esta manera se logró precisar el momento en que el contenido de humedad de la semilla se redujo a 5 y 8%.

### **Germinación de la semilla.**

Para determinar la tolerancia a la desecación se aplicó la prueba de germinación. Se tomaron 3 repeticiones de 40 semillas por cada tratamiento de 5 y 8% de humedad y por cada especie. Antes de la prueba de germinación las semillas fueron colocadas en una cámara de humedad durante 24 horas, para hidratarlas y evitar daños por imbibición, luego de esto fueron desinfectadas por 15 minutos en hipoclorito al 2% (Jiménez & Ramiro, 2016) y enjuagadas 3 veces con agua destilada. La siembra se realizó en una cámara de flujo laminar, se colocaron las semillas en placas Petri (60x15mm) con papel toalla, todo fue esterilizado previamente, a cada placase le añadió 3 ml de agua destilada. Se sellaron las placas con Parafilm y se mantuvieron en cámara de siembra con fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad a temperatura de 25°C/18°C y a humedad

de 86%/51%.Se evaluó la germinación desde la salida de la radícula y se consideró como semilla germinada a aquella cuya radícula era mayor al tamaño del endospermo (figura 18).

### 6.5 Efecto de la interacción de PGPR en *C. capuli* y *C. lancifolia*

Se evaluó la interacción de 2 cepas PGPR (*Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces sp.*) por separado y en combinación sobre la germinación y el crecimiento de plántulas obtenidas a partir de las semillas colectadas de *C. capuli* y *C. lancifolia*, colecta 2017.Se utilizaron como sustrato para la germinación el suelo de la rizósfera de *Cinchona*.

Se trabajó con 4 tratamientos (*Azotobacter chroococcum*, *Streptomyces sp* y *Azotobacter chroococcum* + *Streptomyces sp.* y un grupo control).Por cada tratamiento se utilizó 4 repeticiones de 15 semillas cada una, esto se realizó para ambas especies. La concentración de la cepa aplicada en cada tratamiento fue de  $1 \times 10^8$  UFC (unidades formadores de colonias).Las semillas fueron colocadas en forma ordenada sobre las placas con sustrato suelo de *Cinchona*. Se vertió 3 ml del medio de cultivo de cada cepa indicada sobre las semillas por cada tratamiento (tabla 4). En el caso del grupo control se vertió 3 ml de agua destilada esterilizada.

**Tabla 4.** Tratamientos aplicados indicando la cepa usada y la concentración

Tratamiento	Cepa PGPR	Medio de cultivo	Concentración (UFC)	Volumen añadido
1	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Agar líquido	$1 \times 10^8$	3ml
2	<i>Streptomyces sp.</i>	Agar líquido	$1 \times 10^8$	3ml
3	<i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces sp.</i>	Agar líquido	$1 \times 10^8$ x cada cepa	1.5 ml x cada cepa
Control	-	Agua	-	3ml

### **6.5.1 Preparación del Sustrato: Suelo de *Cinchona***

El suelo extraído de la rizósfera de *Cinchona* fue tamizado y mezclado con agua destilada (100 ml por cada 100 gramos de suelo). Se colocaron 30 gramos aproximadamente de la mezcla en placas Petri (90 x 15 mm) de tal manera que se formó una capa uniforme. Cada placa Petri preparada se esterilizó en autoclave a 125°C durante 30 minutos.

### **6.5.2 Desinfección de la semilla**

Las semillas de *C. capuli* y *C. lancifolia* fueron desinfectadas con hipoclorito al 4% durante 15 minutos (Jiménez & Ramiro, 2016); luego se enjuago 5 veces con abundante agua destilada para eliminar cualquier rastro del desinfectante, que podría dañarlas cepas o evitar la interacción con la semilla.

### **6.5.3 Sembrado de las semillas de *Cinchona***

El sembrado de las semillas desinfectadas se realizó en cámara de flujo laminar. En cada placa Petri preparada con suelo, se colocaron 15 semillas de forma lineal (figura 33), sobre las semillas se vertió 3 ml del medio de cultivo con la cepa indicada en cada tratamiento. Las placas fueron selladas y colocadas de manera inclinada, para luego ser llevadas a cámara de siembra donde se mantuvieron aun fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad a temperatura de 25°C/18°C. Todos estos procedimientos se realizaron asépticamente para evitar cualquier contaminación de la placa (figura 33).



#### **6.5.4 Evaluación de la germinación en interacción con PGPR.**

##### **Porcentaje de germinación**

Se evaluó la germinación de las placas cada 4 ó 5 días desde la salida de la radícula, y se consideró como semilla germinada a aquellas cuya radícula superaba el tamaño del endospermo (figura 18). Se contabilizó con la ayuda de un estereoscopio el número de semillas germinadas en cada tratamiento y se armó una base de datos para el análisis estadístico. El porcentaje de germinación se determinó calculando las semillas germinadas sobre el total de semillas.

##### **Velocidad de la Germinación.**

Para determinar la velocidad de germinación en las semillas se aplicó la fórmula del Índice de velocidad de germinación (IVG) en cada tratamiento y especie.

$$\text{Formula IVG} = \sum (n_i / t_i)$$

$n_i$  = Número de semillas germinadas en el i-ésimo día;

$t_i$  = Tiempo en días, para la germinación en el i-ésimo día;

#### **6.5.5 Evaluación del desarrollo de la plántula**

##### **Porcentaje de Plántulas**

Se consideró como plántula a aquella que presentaba las hojas primarias totalmente fuera de la cubierta de la semilla, (figura 35). El porcentaje de las plántulas se determinó calculando el total de plántulas sobre el total de semillas puestas a germinar.

### **Altura de las plántulas**

Luego de 8 semanas de sembrado se extrajeron aleatoriamente 20 plántulas de cada tratamiento y se midió la longitud de las plántulas desde el inicio del hipocótilo hasta la yema terminal. La medición se realizó en el estereoscopio con el programa "ImageFocusAlpha" (figura 35).

### **Longitud de la raíz en las plántulas**

Se extrajeron aleatoriamente 20 plántulas y se midió la longitud de la raíz principal desde el cuello hasta el ápice radical. La medición se realizó en estereoscopio con el programa "ImageFocusAlpha".

### **Peso seco de las plántulas**

Para determinar el peso seco de las plántulas fue necesario tomar aleatoriamente de cada tratamiento y control 4 repeticiones de 3 plántulas. Estas plántulas fueron secadas en estufa a 130°C durante una hora. Luego del secado se determinó el peso por cada repetición (3 plántulas) en una balanza analítica y se promedió entre 3 para obtener el peso seco por plántula. Fue necesario pesar 3 plántulas por repetición para que el peso sea significativo en la balanza.

## 7 RESULTADOS.

### 7.1 Selección de las semillas de *C. lancifolia* Mutis y *C. capuli* L. Andersson

Las semillas se obtuvieron solo de frutos maduros en dehiscencia (Figura 6). Las ramas de *C. lancifolia* colectadas en junio del 2016 presentaron abundantes frutos inmaduros y pocos en dehiscencia. Muchas de las semillas estaban contaminadas por hongos y carecían de endospermo definido (Figura 7), en cambio las ramas de *C. lancifolia* colectados en agosto del 2017 presentaron mayor porcentaje de frutos en dehiscencia y semillas con menor contaminación. La cantidad de semillas obtenidas por colecta fue muy reducida, debido a lo cual se requirió trabajar con ambas colectas para obtener suficientes semillas para las distintas evaluaciones de caracterización de las semillas y efecto de la interacción con PGPR.

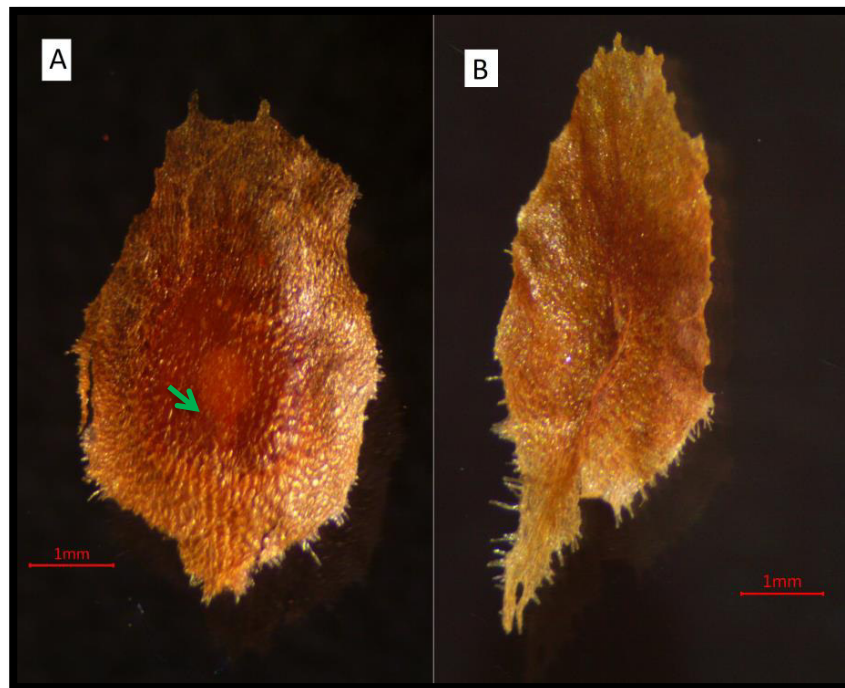
En los frutos de *C. capuli* colectados en junio del 2016, la mayoría estaban en dehiscencia y las semillas presentaron menos contaminación. Las semillas de *C. capuli* se diferenciaban por tener el tegumento más oscuro (Figura 10). Las semillas que se intentaron extraer de los frutos cerrados presentaron inmadurez. En total se trabajó con 3 lotes de semillas; 2 lotes de *C. lancifolia* y 1 lote de *C. capuli* (tabla 5).

**Tabla 5 .** Datos de Colecta de *Cinchona capuli* y *C. lancifolia* realizado en el departamento de Piura en Junio del 2016 y Agosto del 2017

Lote	Código colecta	Especie	Fecha colecta	Localidad	Distrito	Provincia	Departamento
1	19530	<i>Cinchona capuli</i>	Junio 2016	Yantuma	Ayabaca	Ayabaca	Piura
2	19510	<i>Cinchona lancifolia</i>	Junio 2016	Cataluco	Huancabamba	Huancabamba	Piura
3	19578	<i>Cinchona lancifolia</i>	Agosto 2017	Cataluco	Huancabamba	Huancabamba	Piura



**Figura 6.** Extracción y selección de semillas de *Cinchona lancifolia* a partir de frutos en dehiscencia en el Laboratorio de Fisiología Vegetal- Facultad de Ciencias Biológicas- UNMSM.

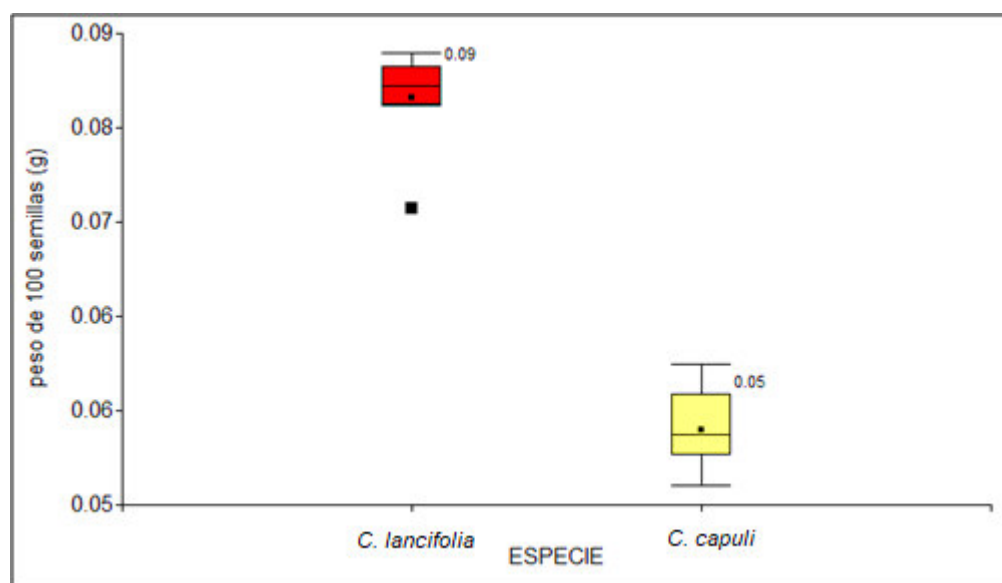


**Figura 7.** Semillas de *Cinchona lancifolia*, **A.** Semilla con endospermo definido y embrión notorio (flecha verde). **B.** Semilla sin endospermo definido y sin embrión aparente.

## 7.2 Caracterización de la semilla

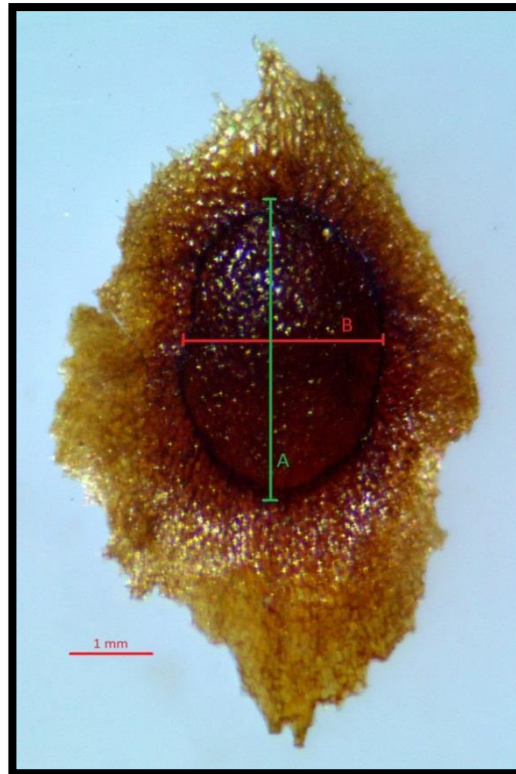
### 7.2.1 Peso y Tamaño de la semilla.

El peso evaluado a 100 semillas con 7 repeticiones para ambas especies resultó en promedio 0.0878 gramos para *C. lancifolia* y 0.0530 gramos para *C. capuli* (Figura 8); estadísticamente presentaron diferencias significativas ( $p.value < 0.05$ ) el peso de ambas especies (Anexo1).



**Figura 8.** Comparación del peso de las semillas de *C. lancifolia* y *C. capuli*

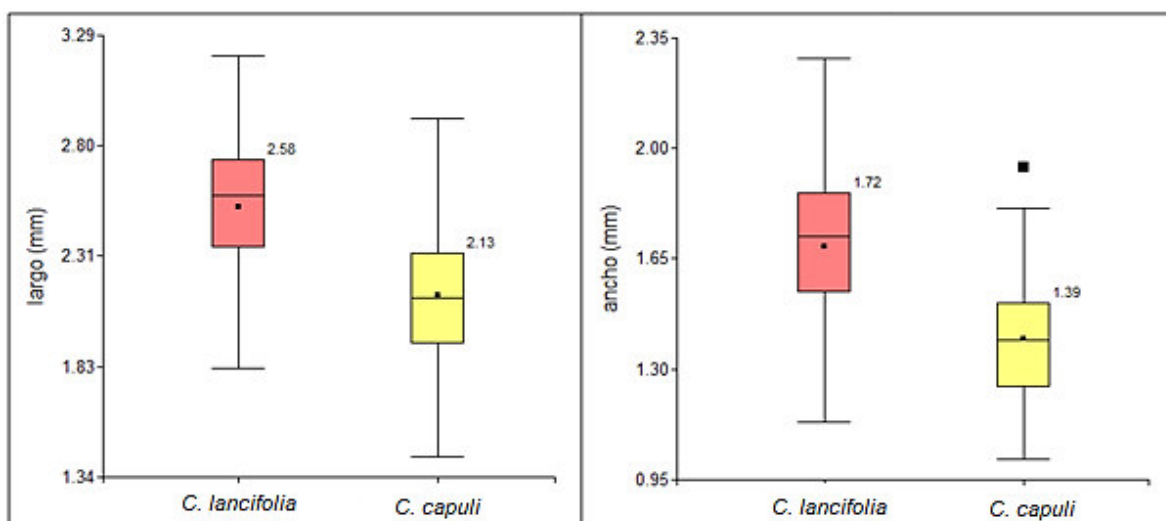
En cuanto al tamaño de la semilla no se consideró la longitud del ala por ser muy irregular, solo se midió el ancho y el largo del endospermo de semillas maduras de frutos en dehiscencia (Figura 9). El tamaño del endospermo en el ancho y el largo presentó diferencias significativas ( $p.value < 0.05$ ) entre ambas especies. La longitud del endospermo realizada a 100 semillas presentó en promedio para *C. lancifolia* 1.72 mm de ancho y 2.58 mm de largo y para *C. capuli* 1.39 mm de ancho y 2.31 mm de largo (Figura 11) (Anexo2).



**Figura 9.** Tamaño de la semilla de *Cinchona lancifolia*. A= Medida de la longitud del endospermo, B= Medida del ancho del endospermo



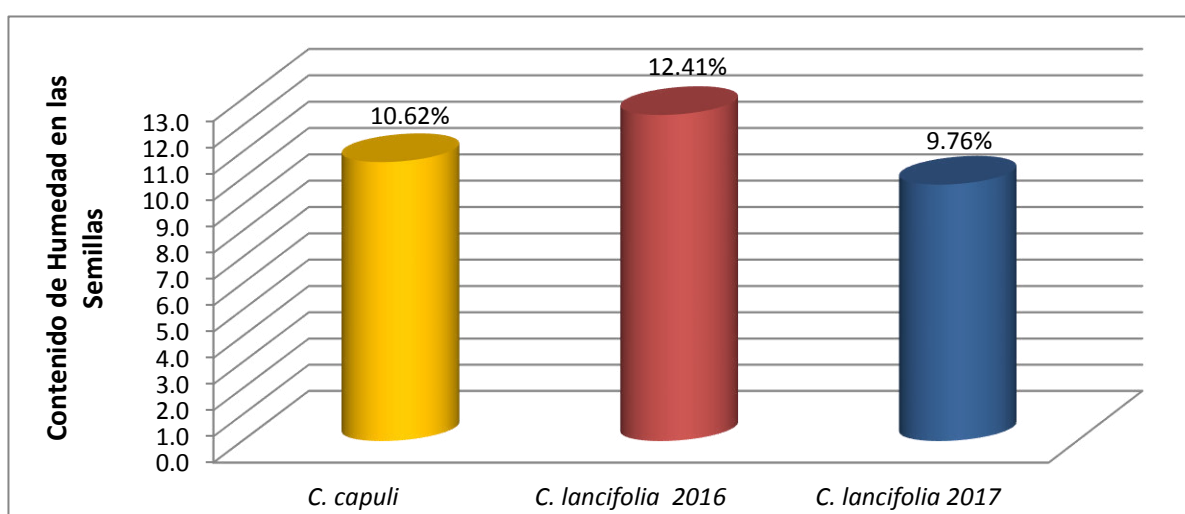
**Figura 10.** Semillas colectadas de *Cinchona lancifolia* (izquierda) y de *C. capuli* (derecha), las cuales difieren en coloración.



**Figura 11.** Comparación del tamaño del endospermo de *C. lancifolia* y *C. capuli*. Izquierda= comparación del largo. Derecha= comparación del ancho.

## 7.2.2 Contenido de Humedad.

El contenido de humedad en los 3 lotes de semillas se determinó a los pocos días después de haber ingresado al Laboratorio (Anexo 3). Los 3 lotes evaluados mostraron variación en el contenido de humedad. Las semillas de *C. capuli* presentaron en promedio 10.62% de contenido de humedad, mientras que *C. lancifolia* colectada en el 2016 presentaron 12.41% de contenido de humedad y *C. lancifolia* colectada en el 2017 presento 9.76% (Figura 12). Estadísticamente no presentaron diferencias significativas ( $p.value > 0.05$ ).

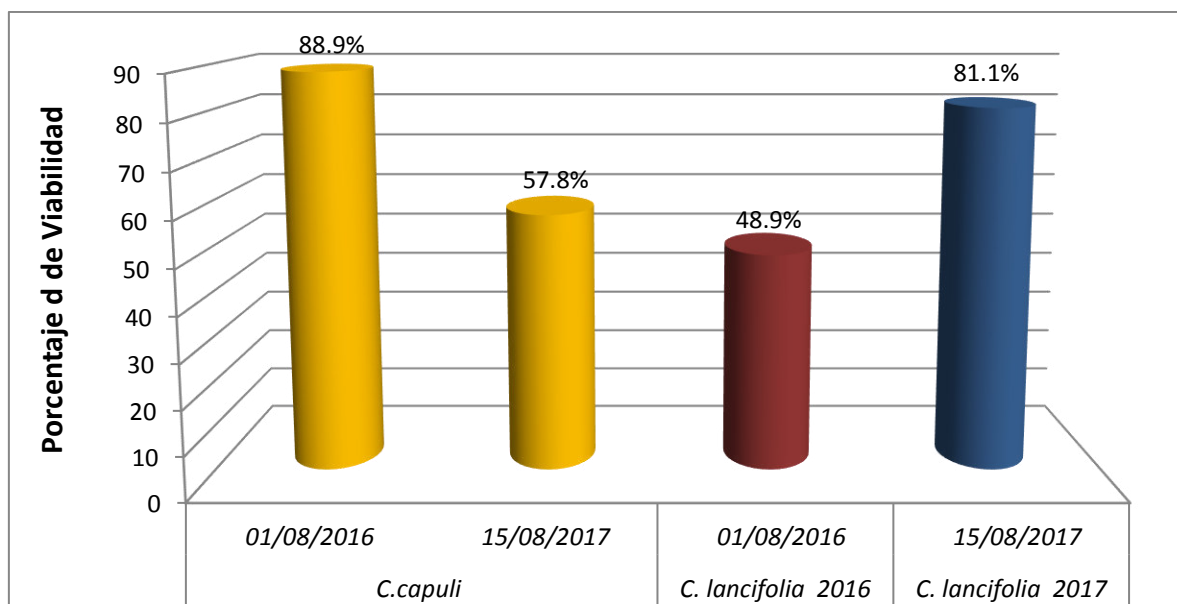


**Figura 12.** Contenido de Humedad de las semillas en los 3 lotes de *Cinchona* colectadas. La humedad se determinó a la semana de colectada las semillas.

### 7.2.3 Viabilidad de las semillas

La prueba de Viabilidad mediante la tinción con Tetrazolium (TZ) se realizó en los 3 lotes de semilla. Se consideró semilla viable a aquella cuyo embrión se tiñe de rojo y no viable a aquella que no se tiñe (figura 14). En *C. capuli* la prueba TZ realizada en el 2016 mostró 88.91% de semillas viables, en cambio la prueba TZ realizada al mismo lote un año después, resultó 57.78% de semillas viables, la prueba fue significativa ( $p.value < 0.05$ ) la cual nos indica una disminución de su viabilidad en 35% (Figura 13), luego de estar almacenada por 1 año a 5°C en sobres herméticos de aluminio. Esto parece indicar que la viabilidad de las semillas disminuye en relación al tiempo de almacenamiento a las condiciones indicadas.

La prueba de viabilidad realizada a los dos lotes de *C. lancifolia* presentó diferencias significativas ( $p.value < 0.05$ ) (anexo 5). Las semillas de *C. lancifolia* colectadas junio del 2016 presentaron 48.89% de viabilidad, en cambio el lote de *C. lancifolia* colectado en Agosto del 2017 presentó 81.11% de viabilidad (Figura 14); esto nos indica que las condiciones climáticas presentes en el momento de la colecta podrían afectar la viabilidad de las semillas (tabla 1).

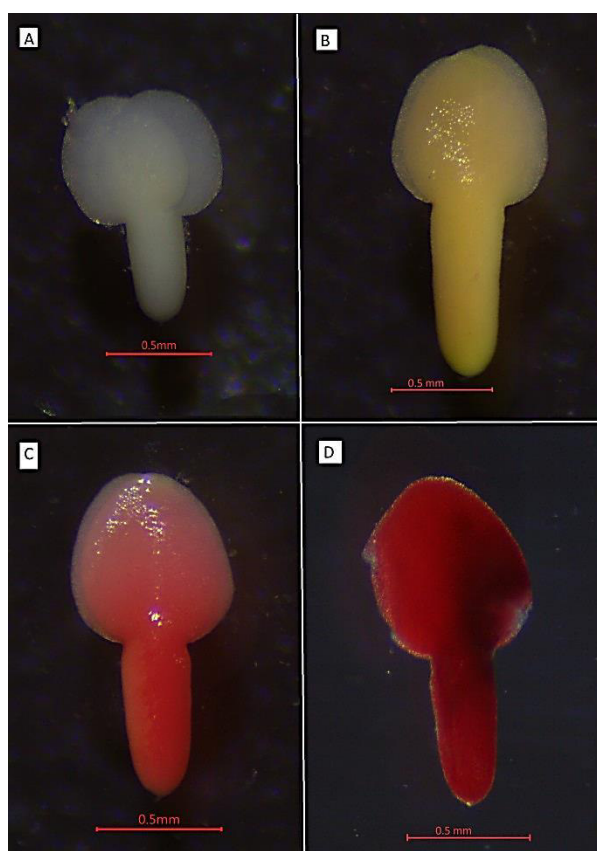


**Figura 13.** Porcentaje de viabilidad de las semillas de *C. capuli* (amarillo) disminuye en el tiempo y *C. lancifolia* muestra mayor viabilidad en la colecta realizada en agosto del 2017 (azul) en comparación con la colecta de Junio del 2016 (rojo).





**Figura 14.** Embriones de *Cinchona lancifolia* extraídos de las semillas luego de la tinción realizada con Tetrazolium. Se muestra la variabilidad en la tinción de los distintos embriones



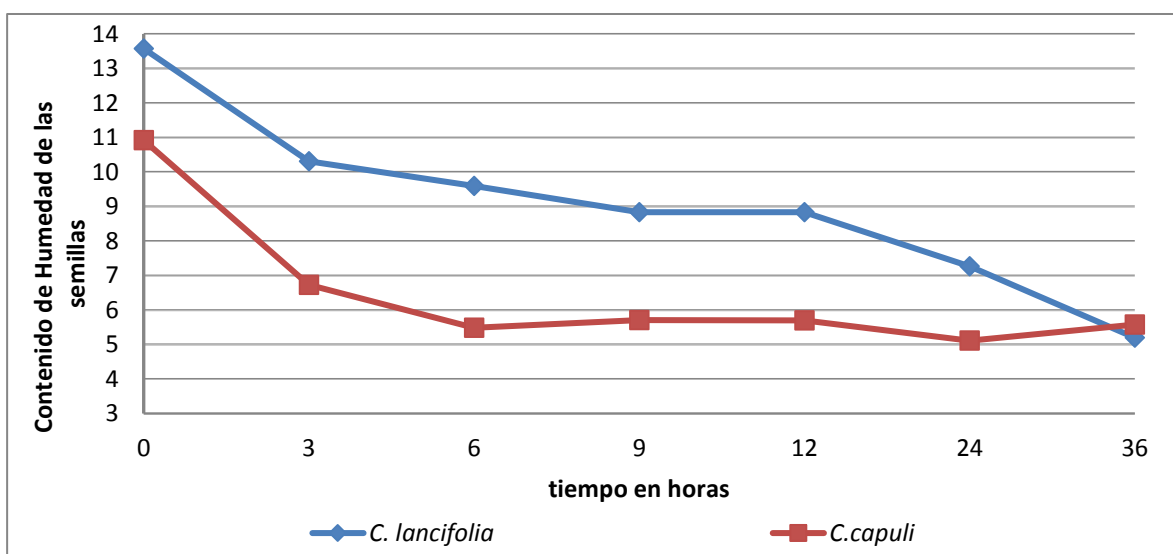
**Figura 15.** Embriones de *Cinchona lancifolia* después de la tinción Tetrazolium. El embrión **A** y **B** no presentan, en cambio el embrión **C** y **D** sí presentan viabilidad.

## 7.2.4 Tolerancia a la desecación

### Reducción de la Humedad

Las semillas de *C. capuli* presentaron en un inicio 10.92% de contenido de humedad; luego de estar por 3 horas en cámara de desecación (humedad relativa 15%) la humedad de las semillas se redujo a 6.73%, luego de 6 horas se redujo a 5.48% y con más horas en la cámara de desecación, la humedad de la semilla no varió mayormente (osciló entre 5 y 6% de humedad). En el caso de las semillas de *C. lancifolia* solo se trabajó con las semillas colectadas en el 2016 y su contenido de humedad inicial fue de 13.75%; luego de estar por 3 horas en cámara de desecación (humedad relativa 15%), la humedad de las semillas se redujo a 10.31%, luego de 6 horas siguió disminuyendo a 9.59%. Para esta especie fue necesario mantenerlo más horas en la cámara de desecación para reducir más su contenido de humedad, alcanzando luego de 9 horas una humedad de 8.83%, y luego de 36 horas un contenido de humedad de 5.19%.

Se logró determinar por interpolación que las semillas de *C. capuli* disminuyeron a 8 y 5% de humedad luego de estar en la cámara de desecación a 1 y 6 horas respectivamente. Para el caso de las semillas de *C. lancifolia* 2016 se lograron reducir la humedad a 8 y 5% después de 9 y 36 horas de estar en la cámara de desecación (Figura 16).

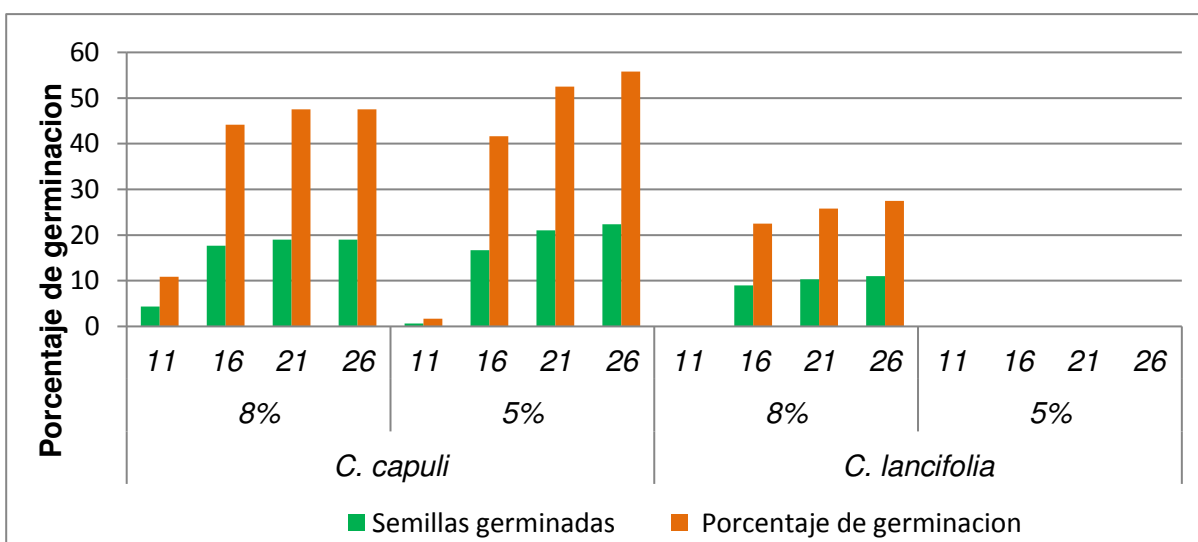


**Figura 16.** Variación de la humedad en las semillas de *C. lancifolia* y *C. capuli* en el tiempo a cámara de desecación a 15 % de humedad relativa v Temperatura ambiental (25°C).

### Germinación a 8% y 5 % de contenido de humedad de las semillas

Las semillas de *C. capuli* y *C. lancifolia* ajustadas a 5% y 8% de contenido de humedad fueron almacenadas durante 1 mes a 5°C. Luego de lo cual se evaluó su porcentaje de germinación (Figura 19). Para *C. capuli* se obtuvo una germinación de 47.50% y 55.83% a contenidos de humedad de 8% y 5% respectivamente, pese a que no mostraron diferencias significativas, los resultados estarían indicando que se trata de una especie que tolera la desecación (especie probablemente Ortodoxa). En el caso de *C. lancifolia* se obtuvo una germinación de 27.5% y 0% a contenidos de humedad de 8% y 5% respectivamente, estos resultados presentaron diferencias significativas (anexo 7). Esto estaría indicando que las semillas de *C. lancifolia* no toleran la desecación, ya que pierden totalmente su viabilidad (especie probablemente intermedia) (Figura 17).

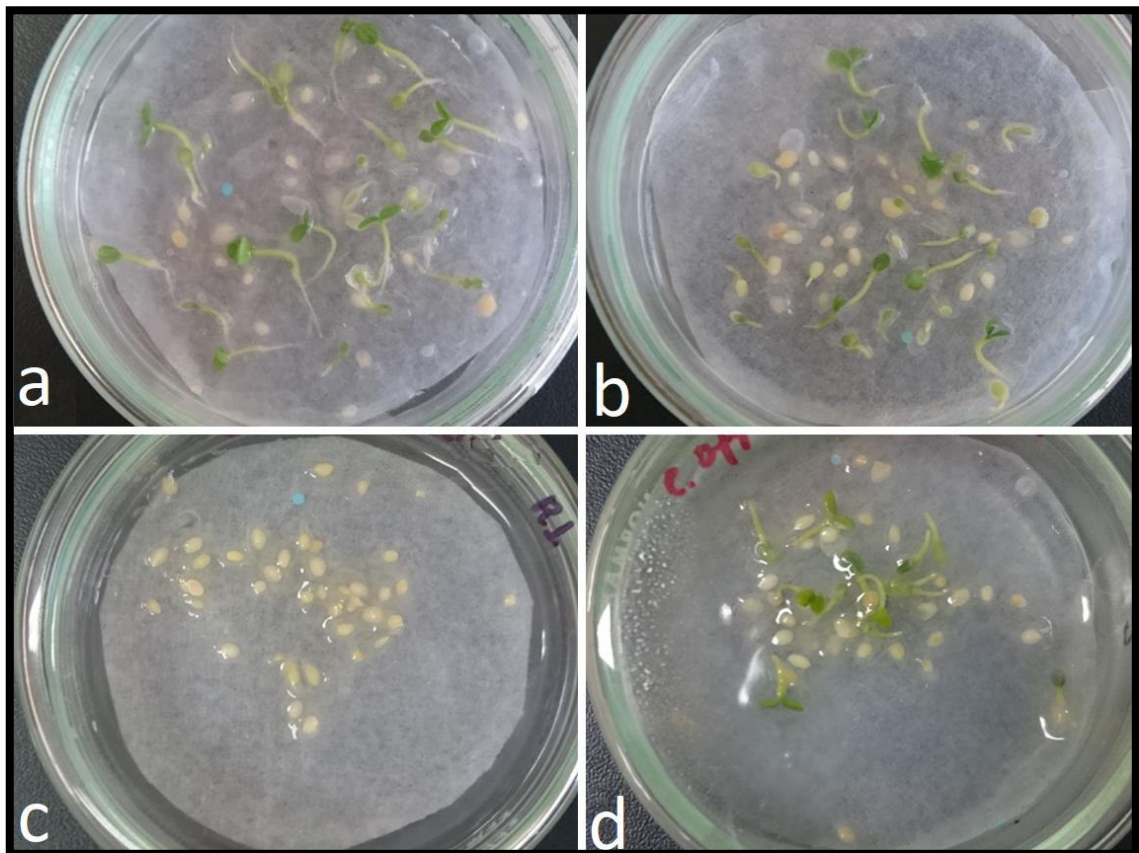
Tomando en consideración que la viabilidad de *C. lancifolia* al ingreso de laboratorio fue de 48,89% a un contenido de humedad del 12.41% y que al ser desecadas a 8% de contenido de humedad su germinación se reduce a 27.5%, esto refuerza la idea de que se trata de una especie del tipo intermedia (Hong & Ellis 1996) (Conde, 2016).



**Figura 17.** Germinación en el tiempo (días) a dos condiciones de contenido de humedad de las semillas (5 y 8%) para *C. capuli* y *C. lancifolia*.



**Figura 18.** Germinación de *Cinchona lancifolia* en el tiempo, a= Inicio de la germinación a los 11 días; b= Elongación de la raíz a los 16 días.



**Figura 19.** Germinación según el contenido de humedad de las semillas de *C. capuli* (a=5%, b=8% contenido de humedad) y *C. lancifolia* (c= 5%, d=8% contenido de humedad)

### **7.3 Efecto de la Interacción con PGPR**

#### **7.3.1 A nivel de la germinación**

##### **7.3.1.1 Porcentaje de Germinación en interacción con PGPR**

###### ***C. capuli***

En el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* el porcentaje de germinación fue de 71.67%, para *Streptomyces sp.* fue de 61.67%, en el caso del tratamiento combinación de *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.* fue de 60.0 % y para el control resulto de 50.0%(Figura 20). Los tratamientos presentaron mayor promedio de porcentaje de germinación en comparación con el control, pero no presentaron diferencias significativas ( $p.value > 0.005$ ).

La germinación inicio a partir de los 14 días después de sembrado, fecha en la cual se evaluó el porcentaje de germinación. En el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* presento 53.33% de germinación inicial, para el tratamiento con *Streptomyces sp.* la germinación inicial fue de 45.0% y en el tratamiento de *A. chroococcum* + *Streptomyces sp* la germinación inicial fue de 43.33%. En el control la germinación a los 14 días fue de 36.66%(figura 21).

El tratamiento con *Azotobacter chroococcum* y el control presentaron su máxima germinación a los 29 días después de sembrado con un porcentaje de 71.67% y 50.0% respectivamente. Para el tratamiento con *Streptomyces sp.* presentó a los 35 días su máxima germinación con 61.67% y en el tratamiento *A. chroococcum* + *Streptomyces sp* la germinación se dio hasta los 56 días llegando al 60% (figura 21).

###### ***C. lancifolia***

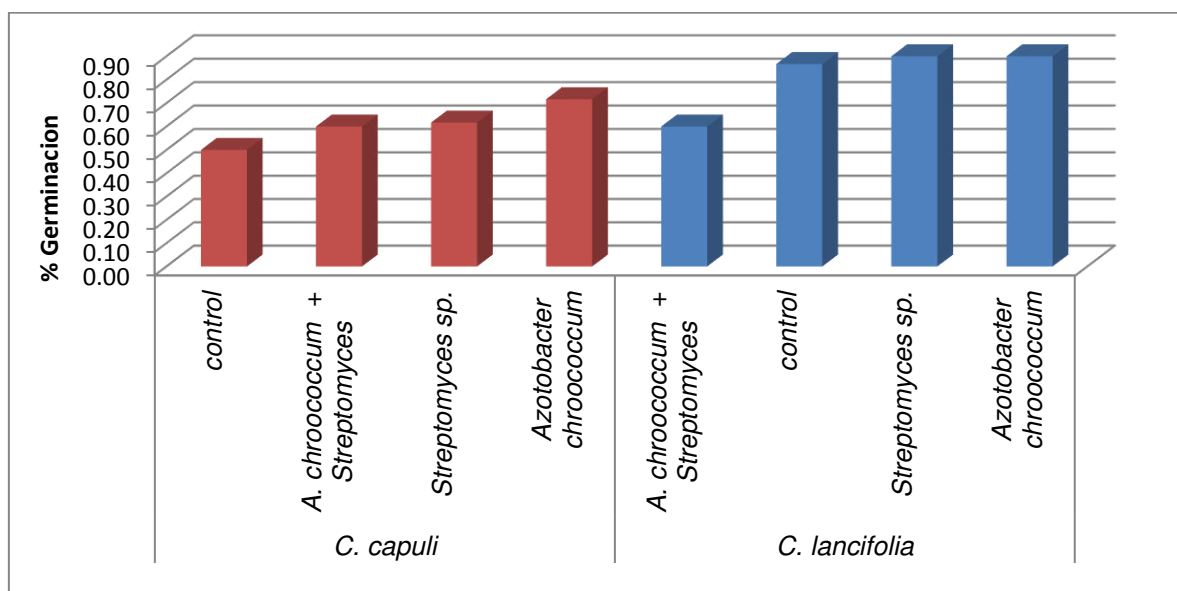
En el tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.* el porcentaje de germinación fue de 91.7%. Para el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* y con *Streptomyces sp.* el porcentaje de germinación fue de 90% en ambos tratamientos. Para el control la

germinación fue de 86.7%. No se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos ( $p.value > 0.05$ ) (Figura 20).

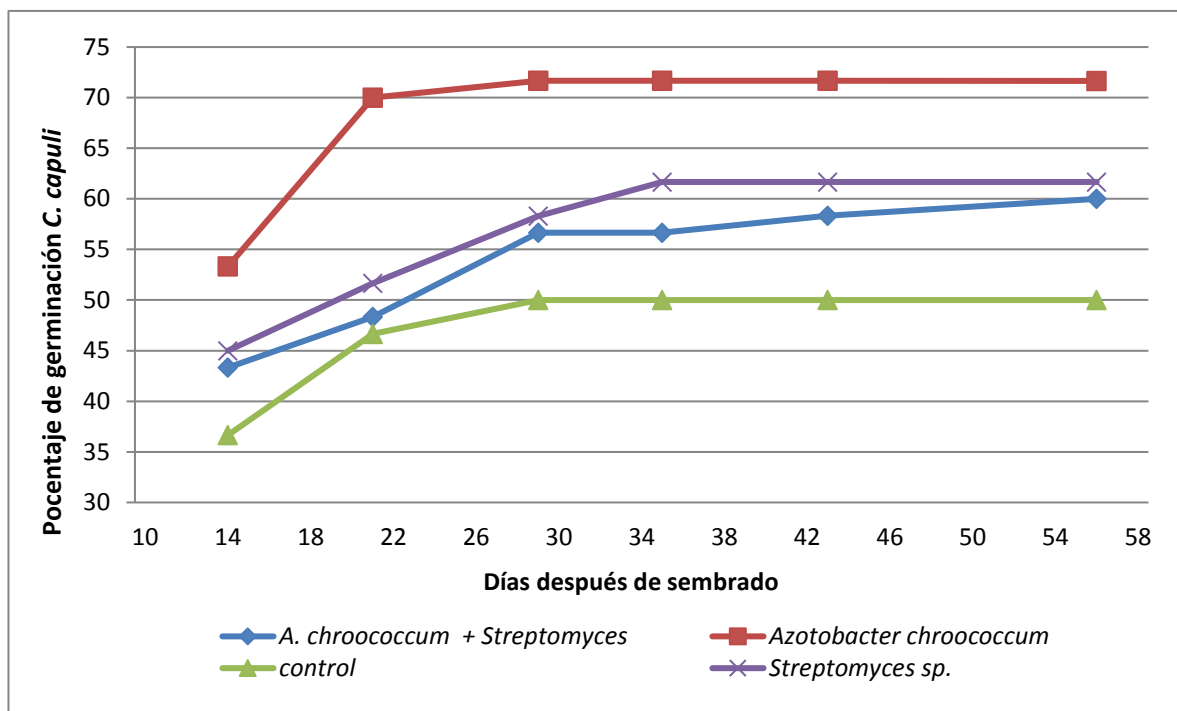
Al igual que *C. capuli* en *C. lancifolia* la germinación y evaluación inicio a partir de los 14 días después de sembrado. En el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* la germinación inicial fue de 35.0%, para el tratamiento con *Streptomyces* sp. presentó 25.0% de germinación inicial y en el tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces* sp. la germinación inicial fue de 6.7%, significativamente inferior a los demás tratamientos. En el control la germinación inicial fue de 43.33% (anexo 19).

La germinación en el control llegó a su máximo porcentaje 86.7% a los 35 días después de sembrado, en cambio en todos los tratamientos presentaron su máximo porcentaje de germinación a los 56 días (Figura 22). En el tratamiento *A. chroococcum* + *Streptomyces* sp. se aprecia un incremento uniforme de la germinación.

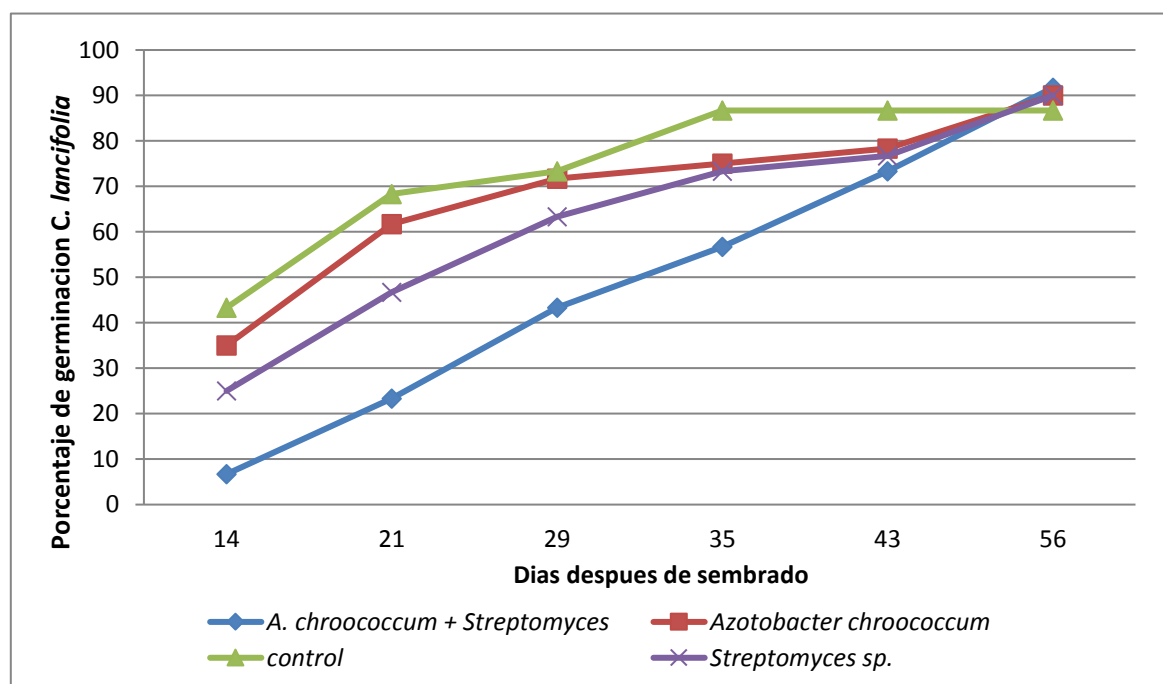
Se mostraron diferencias significativas ( $p.value < 0.05$ ) en el porcentaje de germinación entre ambas especies de *Cinchona* (Anexo 8).



**Figura 20.** Porcentaje de germinación de *Cinchona lancifolia* y *C. capuli* en los tratamientos con *Azotobacter chroococcum*, *Streptomyces* sp y *A. chroococcum* + *Streptomyces* sp. a los 56 días después de sembrado.



**Figura 21.** Curso de la Germinación de *C. capuli* en los tratamientos con *Azotobacter chroococcum*, *Streptomyces sp.*, *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.*



**Figura 22.** Curso de la Germinación de *C. lancifolia* en los tratamientos con *Azotobacter chroococcum*, *Streptomyces sp.*, *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.*



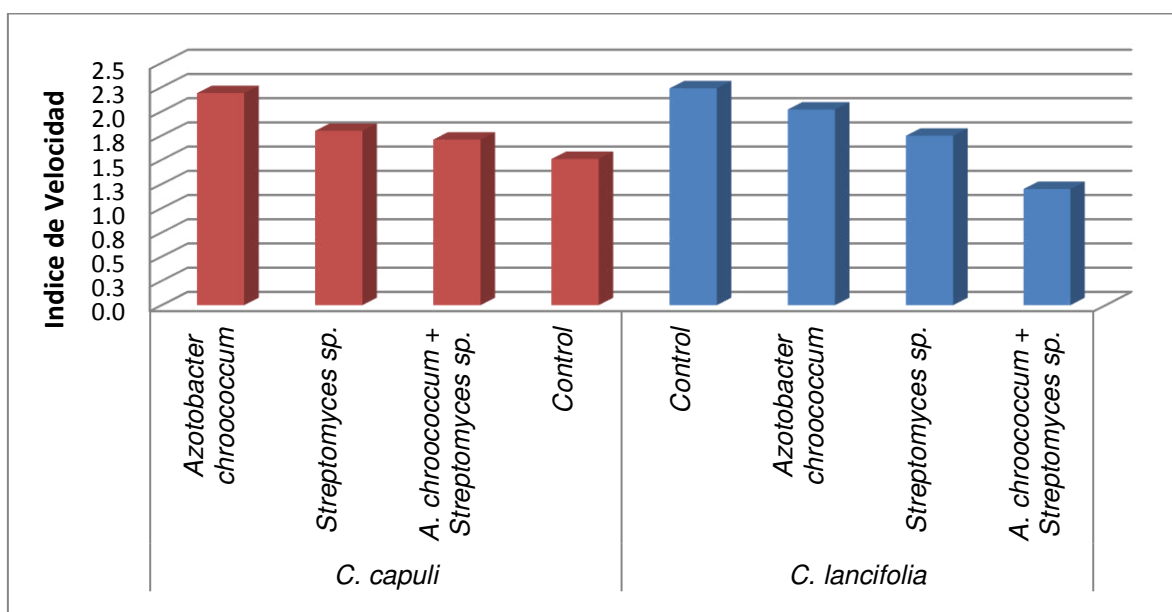
### 7.3.1.2 Velocidad de Germinación

#### *C. capuli*

Los tratamientos presentaron mayor índice de velocidad de germinación que el control, pero no presentaron diferencias significativas ( $p.value > 0.05$ ). En el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* presentó el mayor índice de velocidad de germinación de 2.19, el tratamiento con *Streptomyces sp.* fue de 1.80 y el tratamiento de *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.* fue de 1.71. Mientras que el grupo control presentó un índice de velocidad de germinación de 1.51 (Figura 23) (anexo 9).

#### *C. lancifolia*

Los tratamientos y el control no presentaron diferencias significativas ( $p.value > 0.05$ ). Para el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* la velocidad de germinación fue de 2.02, en el tratamiento con *Streptomyces sp.* la velocidad de germinación resultó 1.75 y en el tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.* presentó el menor índice de velocidad de germinación con 1.20. El control presentó mayor índice de Velocidad de Germinación 2.24 (Figura 23) (anexo 10).



**Figura 23.** Índice de Velocidad de germinación en los distintos tratamientos y control para *C. capuli* y *C. lancifolia*



### 7.3.2 A nivel de plántulas

#### 7.3.2.1 Porcentaje de Plántulas

##### ***C. capuli***

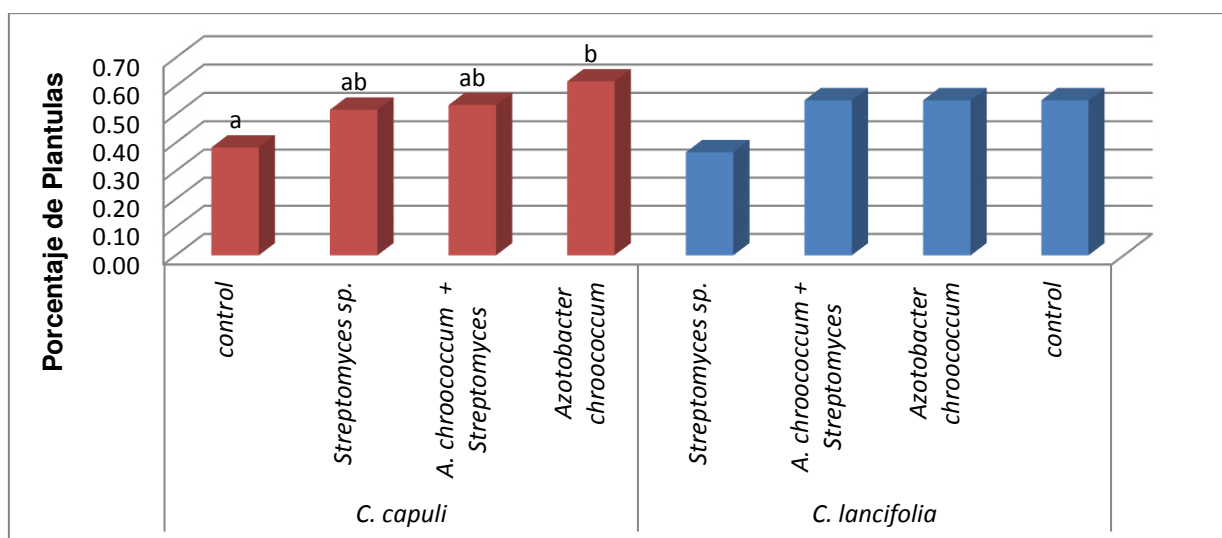
Se evaluó el porcentaje de plántulas formadas a los 40 días después de iniciada la germinación. En la formación de plántulas, solo el tratamiento con *Azotobacter chroococcum*, presento diferencias significativas ( $p.value < 0.05$ ) con el control, aumentando el porcentaje de plántulas (anexo 11). El tratamiento con *Azotobacter chroococcum* formó en promedio un 61.67% de plántulas, mientras que en los tratamientos con *Streptomyces sp.* y *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.* el promedio de plántulas formadas fue de 51.67% y 53.33% respectivamente. En el tratamiento control presento en promedio 38.33% de plántulas (tabla 6) (Figura 24).

##### ***C. lancifolia***

Se evaluó el porcentaje de plántulas formadas a los 40 días después de iniciada la germinación. El porcentaje de plántulas en promedio obtenidas en los tratamientos con *Azotobacter chroococcum*, *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.* y el control fue de 55.0% para los 3 casos. En el tratamiento con *Streptomyces sp.* el porcentaje de plántulas obtenidas fue menor con 36.67% (Figura 24). Los tratamientos no presentaron diferencias significativas estadísticamente (anexo 11).

**Tabla 6.** Porcentaje de plántulas de *C. capuli* y *C. lancifolia* formadas en los distintos tratamientos

ESPECIE	TRAt.	Variable	Media	D.E.	Mín	Máx
<i>C. capuli</i>	<i>A. chroococcum</i> + <i>Streptom.</i>	% plántulas	0.53	0.08	0.47	0.60
<i>C. capuli</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>	% plántulas	0.62	0.15	0.47	0.80
<i>C. capuli</i>	control	% plántulas	0.38	0.10	0.27	0.47
<i>C. capuli</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	% plántulas	0.52	0.06	0.47	0.60
<i>C. lancifolia</i>	<i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomy.</i>	% plántulas	0.55	0.03	0.53	0.60
<i>C. lancifolia</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>	% plántulas	0.55	0.27	0.20	0.87
<i>C. lancifolia</i>	control	% plántulas	0.55	0.10	0.47	0.67
<i>C. lancifolia</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	% plántulas	0.37	0.25	0.20	0.73



**Figura 24.** Comparación de los porcentaje de plántulas formadas de *C. capuli* y *C. lancifolia*. En los tratamientos con PGPRs y el control. Se muestran diferencias estadísticas en *C. capuli* (tratamientos con letra común no presenta diferencias)

### 7.3.2.2 Altura de las plántulas

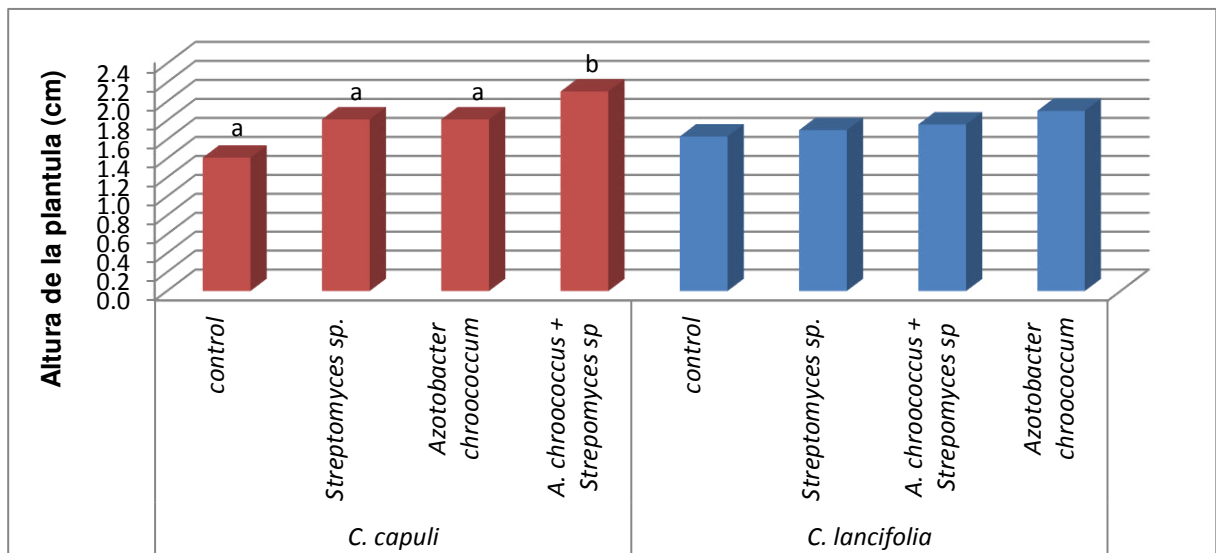
#### *C. capuli*

Los datos obtenidos de las alturas de las plántulas en los distintos tratamientos no presentaron Normalidad ( $p.value < 0.05$ ), por lo que fueron evaluados con un estadístico No paramétrico usando la prueba de Kruskal Wallis. El tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces* sp. presentó diferencias significativas ( $p.value < 0.05$ ) en comparación con los otros tratamientos (anexo 12). El tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces* sp. presentó como altura promedio de las plántulas 2.11 cm, en los tratamientos con *Azotobacter chroococcum* y con *Streptomyces* sp. la altura promedio fue de 1.81 cm en ambos casos. El control presentó 1.41 cm de promedio de altura de plántulas (Figura 25).

#### *C. lancifolia*

Los datos de la altura de las plántulas no presentaron Normalidad ( $p.value < 0.05$ ), por lo que se evaluaron los datos con un estadístico No paramétrico usando la prueba de Kruskal Wallis. Todos los tratamientos no aumentaron significativamente ( $p.value > 0.05$ ) la longitud de las plántulas. El tratamiento con *Azotobacter chroococcum* obtuvo el mayor

promedio de altura de plántulas con 1.90 cm, asimismo el tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces* sp. obtuvo 1.76 cm y en el tratamiento *Streptomyces* sp. presentó 1.70 cm. En el control la longitud de la plántula promedio fue de 1.63 cm. En todos los tratamientos presentaron tendencia a incrementar la longitud de las plántulas en comparación al control (Figura 25).



**Figura 25.** Comparación de la altura de las plántulas de *C. capuli* y *C. lancifolia* en los distintos tratamientos con PGPR y el control. Se muestran diferencias estadísticas en *C. capuli* (tratamientos con letra común no presenta diferencias)

### 7.3.2.3 Longitud de la raíz de las plántulas

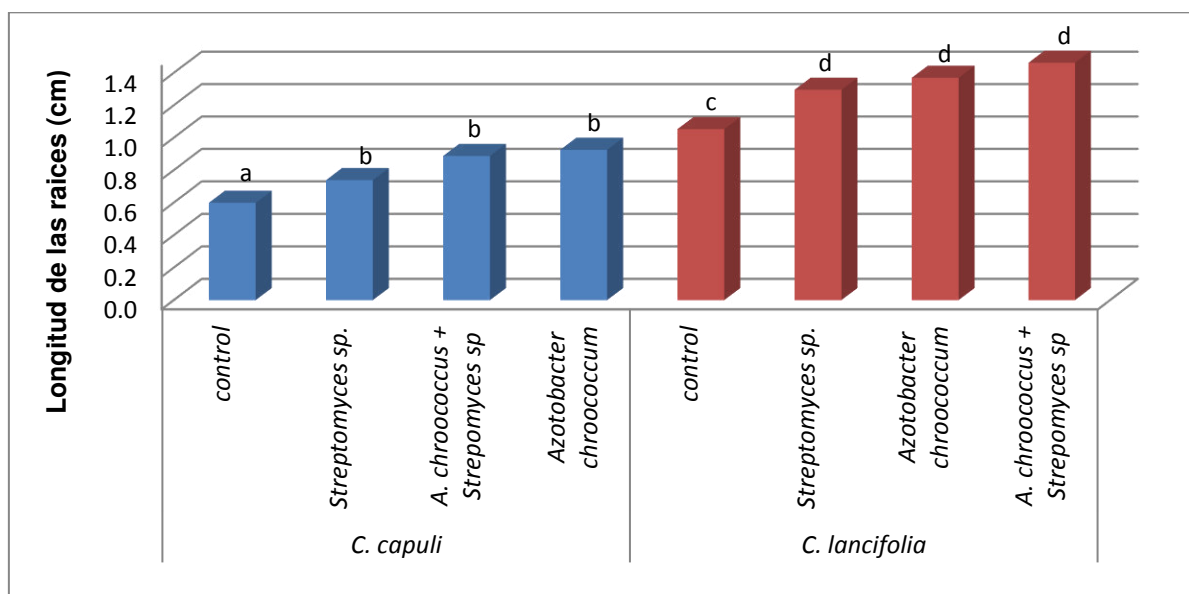
#### *C. capuli*

Los datos obtenidos de la longitud de las raíces en las plántulas no mostraron Normalidad ( $p\text{-value} < 0.05$ ) por lo que se evaluaron los datos con un estadístico No paramétrico usando la prueba de Kruskal Wallis. Todos los tratamientos aumentaron significativamente ( $p\text{-value} < 0.05$ ) la longitud de las raíces frente al control (anexo 13). Así, para el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* se obtuvo en promedio 0.93 cm de longitud de raíz, mientras que en el tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces* sp. presentó en promedio 0.89 cm y en el tratamiento con *Streptomyces* sp. fue de 0.74 cm.

Para el control el promedio de la longitud de las raíces fue de 0.60 cm (figura 26 y 27) (tabla 7).

### ***C. lancifolia***

Los datos no mostraron Normalidad ( $p.value < 0.05$ ) por lo que tuvieron que ser evaluados con la prueba de Kruskal Wallis. Todos los tratamientos aumentaron significativamente ( $p.value < 0.05$ ) la longitud de las raíces frente al control. La longitud promedio de las raíces en el tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces* sp. fue el mayor con 1.46 cm, mientras que para el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* fue de 1.37 cm y para el tratamiento con *Streptomyces* sp. resultó 1.30 cm. En el control presento 1.05 cm de longitud de las raíces (Figura 26).



**Figura 26.** Longitud de las raíces de *C. capuli* y *C. lancifolia* en los distintos tratamientos con PGPR y el control. Se muestran diferencias estadísticas en ambas especies (tratamientos con letra común no presenta diferencias)

**Tabla 7.** Altura de plántulas y Longitud de raíces de *C. capuli* y *C. lancifolia* en los distintos tratamientos

Especie	tratamiento	Altura Promedio de plántulas	Longitud Promedio de raíz
<b><i>C. capuli</i></b>	control	1.410	0.599
	<i>Streptomyces sp.</i>	1.813	0.739
	<i>Azotobacter chroococcum</i>	1.813	0.926
	<i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces sp</i>	2.107	0.888
<b><i>C. lancifolia</i></b>	control	1.633	1.053
	<i>Streptomyces sp.</i>	1.700	1.296
	<i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces sp</i>	1.760	1.463
	<i>Azotobacter chroococcum</i>	1.903	1.370



**Figura 27.** Plántulas de *C. capuli*. **a=** Tratamiento con *Azotobacter chroococcum*; **b=** Tratamiento *A. chroococcum* + *Streptomyces sp*; **c=** Tratamiento con *Streptomyces sp*; **d=** Tratamiento Control. Escala: 0.5 cm (rojo).

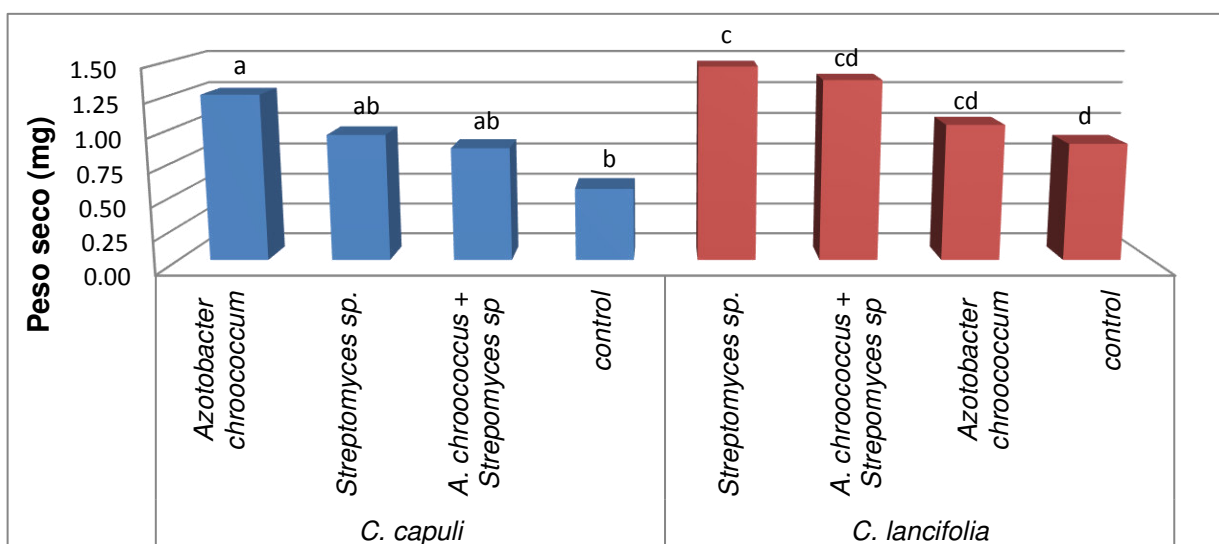
### 7.3.2.4 Peso seco de las plántulas

#### *C. capuli*

Al evaluar el peso seco de las plántulas obtenidas en los tratamientos con PGPR, se encontró que solo el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* presentaba diferencias significativas ( $p.value < 0.05$ ) frente al control (anexo 14). Este tratamiento con *Azotobacter chroococcum* obtuvo como peso seco 1.26 mg/plántula. Los pesos secos promedio de los demás tratamientos fueron, con *Streptomyces sp.* 0.96 mg/plántula y con *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.* fue de 0.86 mg/plántula, valores mayores aunque no significativos al control de 0.55 mg/plántula de peso seco (Figura 28).

#### *C. lancifolia*

El tratamiento con *Streptomyces sp.* presentó como peso seco promedio 1.47 mg/plántula, significativamente mayor al control con 0.89 mg/plántula (anexo 14). En el tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.* obtuvo 1.37 mg/plántula y en el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* resultó 1.03 mg/plántula, para ambos casos los resultados fueron superiores al control pero no presentaron diferencias significativas.



**Figura 28.** Comparación del peso seco de las plántulas de *C. capuli* y *C. lancifolia* en los diferentes tratamientos con PGPR y el control. (Tratamientos con letra común no presenta diferencias)

## 8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 Colecta de frutos de *C. lancifolia* y *C. capuli*

La colecta se dio en temporadas de baja precipitaciones (Figura 5). Los frutos de *Cinchona* colectados presentaron diferente estadio de maduración por lo que su coloración y tamaño variaba (Figura 32). Para el caso de *C. lancifolia* la colecta de los frutos se realizaron en Huancabamba (Piura) en junio del 2016 y agosto del 2017. La cantidad de semillas obtenidas en ambas colectas fue baja, siendo la colecta realizada en agosto del 2017 la que presentó mayor cantidad de frutos en dehiscencia y semillas maduras en comparación con la realizada en junio del 2016; estas diferencias podrían deberse a las condiciones climáticas presentes en el año de la colecta, en el caso de *C. lancifolia* la colecta realizada en el 2016 se dio luego de meses con bajas precipitaciones en cambio la colecta del 2017 se dio en luego de meses con alta precipitaciones; sin embargo para Loja (Ecuador), Aponte y San Martín (2011) plantean que la colecta de semillas de *Cinchona officinalis* realizada en el mes de mayo (época seco con bajas precipitaciones) presentaron frutos en buen estado de madurez fisiológica. Esto nos muestra que la maduración de los frutos y semillas podría variar de acuerdo a la zona de distribución y de la especie (Figura 1). La colecta de frutos de *C. capuli* se realizó en Ayabaca (Piura) en las mismas fechas que *C. lancifolia*. En la colecta realizada en junio-julio del 2016 se obtuvo una cantidad abundante de semillas debido a que la mayoría de frutos estaban en dehiscencia, en cambio en agosto del 2017 solo presentaron frutos en inicio de maduración, por lo que no se pudo extraer semillas y solo se trabajó con las semillas obtenidas en junio-julio del 2016.

## **8.2 Selección y desinfección de las semillas**

La contaminación inicial de las semillas por hongos y bacterias influye negativamente durante la germinación y también en la supervivencia posterior de las plántulas, por ello en la selección de semillas se separaron todas aquellas que presentaban contaminación por hongos e incluso por artrópodos los cuales parasitaban el interior de la semilla haciéndose imperceptible a simple vista. La viabilidad de las semillas depende de la cantidad y calidad de sustancias químicas presentes en el endospermo, el cual es el tejido de reserva que mantendrá al embrión (Niembro, 1990); debido a ello la selección de las semillas se descartó a aquellos que carecían de endospermo o no presentaban el endospermo muy definido.

## **8.3 Peso y tamaño de la semilla**

Se encontraron diferencias significativas entre *C. capuli* y *C. lancifolia* a nivel del peso y tamaño de las semillas, esta diferencia podría deberse a diferencias propias de la especies así como a la variación en la maduración y contenido de humedad que presentaron ambas semillas al momento de la colecta.

## **8.4 Contenido de Humedad**

La determinación del contenido de humedad de las semillas se realizó a los días de ingreso al laboratorio y se utilizó el método de secado a estufa propuesto por el ISTA (2005). Mejía (2014) menciona que el contenido de humedad en las semillas de *Cinchona* puede variar desde 1.4% a 23.6% atribuyendo esta variación al tipo de almacenamiento así como a la capacidad higroscópica de las semillas de absorber humedad del entorno. En el presente trabajo el contenido de humedad para *C. lancifolia* varió en relación a la fecha de colecta, las semillas colectadas en junio del 2016 presentaron 12.41% en cambio las colectadas en agosto del 2017 presentaron 9.76% de contenido de humedad. Para el caso de las semillas de *C. capuli* presentaron 10.62% de contenido de humedad.



Estas diferencias del contenido de humedad pueden deberse a la variación presente durante la maduración de las semillas hasta alcanzar el máximo vigor y poder germinativo en su punto máximo de peso seco (Popiniguis, 1985).

### **8.5 Viabilidad de las semillas**

La prueba de tinción con Tetrazolium (TZ) ha sido utilizada para demostrar la viabilidad y/o calidad de las semillas (Englert, 2007), pero no determina si una semilla está en dormancia, solo estima la viabilidad de la muestra (Camacho, 1994). Las semillas de *C. lancifolia* colectadas en agosto del 2017 presentaron a la semana de colectadas, mayor viabilidad (81.1%) que las semillas colectadas en junio del 2016 (48.9%). Esta diferencia puede deberse a la variación de la madurez y el contenido de humedad de las semillas en el momento de colecta, siendo que las semillas con mayor viabilidad fueron las que presentaron menor contenido de humedad (9.78%) al momento de la colecta, asimismo (Roberts, 1972) señala que el contenido de humedad es uno de los factores importantes en la viabilidad de las semillas.

En cuanto a la viabilidad según el tiempo de almacenamiento, las semillas de *C. capuli* redujeron su viabilidad luego de almacenarse durante 1 año a bajas temperaturas, esto corrobora lo planteado por Moreno (1996) quien manifiesta que la germinación de las semillas de *Cinchona* disminuye considerablemente luego de ocho meses de almacenamiento cuando empiezan a perderla viabilidad significativamente, esto también contradice lo planteado por Mejía (2014), quien menciona que el tiempo de almacenamiento no afecta la viabilidad y el porcentaje de germinación, además menciona que las semillas almacenadas por un tiempo mejoran su germinación.

## 8.6 Tolerancia a la desecación

Se consideran como semillas ortodoxas no solamente a aquellas que sobreviven a una desecación considerable (al menos a 5% de contenido de humedad) sino a aquellas cuya longevidad en almacenamiento aumenta de forma predecible, si se les reduce el contenido de humedad y la temperatura de almacenamiento de la semilla (Roberts, 1972). En el presente trabajo cuando se reduce el contenido de humedad de las semillas de *C. capuli* a 8% y 5%, logran germinar, mostrando de esta forma tolerancia a la deshidratación y por lo tanto caracterizándose como ortodoxa. Bewley et al. (2013) menciona que la viabilidad y la germinación de numerosas semillas ortodoxas mejoran luego de un tiempo de almacenamiento bajo condiciones específicas como bajas temperaturas. Pero en el caso de las semillas de *C. capuli* no presentaron esta particularidad debido a que más bien, mostraron una notoria disminución de su viabilidad luego de 1 año de almacenamiento.

Si bien las semillas recalcitrantes son aquellas que no soportan contenidos de humedad menores a 12%, sin disminuir su viabilidad manteniéndose así sensibles a la deshidratación (Pritchard y Manger, 1998), las semillas con carácter intermedias son aquellas que mantienen su viabilidad entre los 10% y 12% de contenido de humedad pero la disminuyen considerablemente al reducirse a 5% (Hong y Ellis, 1996) (Figura 3).

En la prueba de germinación de *C. lancifolia* cuando se le reduce el contenido de humedad a 8% logran germinar, pero al reducirse a 5% no germinan, disminuyendo considerablemente su viabilidad y caracterizándose como semillas intermedias (no ortodoxas), asimismo esto podría explicar la menor viabilidad de las semillas colectadas en 2016, la cual se dio en una temporada seca y de poca precipitación (Figura 2). Esto contradice lo propuesto por Mejía (2014), quien utilizando el método Predicting desiccation sensitivity in Woody species (Gold & Hay, 2008), considera que las semillas de *Cinchona* son ortodoxas.

Estas diferencias del carácter de las semillas en las especies estudiadas, puede deberse a la distribución geográfica y condiciones genotípicas de las especies. El carácter ortodoxo de las semillas de *C. capuli* permite inferir mayor tolerancia a las variaciones en su hábitat en comparación a *C. lancifolia*.

## **8.7 Efecto de la interacción con PGPRs**

### **8.7.1 A nivel de la germinación**

Para evaluar el efecto de los PGPRs sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de *Cinchona lancifolia* y *C. capuli* se utilizó como sustrato el suelo de la rizósfera de *Cinchona*, extraído a 20 cm de profundidad. Este suelo se caracterizó por presentar un alto porcentaje de materia orgánica (10.59%) y un bajo pH (4.48)(anexo 15).El alto contenido de materia orgánica incrementa el porcentaje de germinación en las semillas de *Cinchona* (Conde, 2016), asimismo el bajo pH del suelo es un factor limitante para muchas PGPR, debido a que la mayoría de PGPR se desarrollan mejor en pH alcalinos (Echevarría, 2011). Al utilizar este suelo como sustrato para la germinación con PGPRs se estarían considerando las mismas condiciones que podrían presentarse en su hábitat natural.

La germinación de *C. capuli* y *C. lancifolia* en los tratamientos con PGPRs y control no presentaron diferencias significativas estadísticamente, aunque sí se mostró una tendencia en aumentar el porcentaje de germinación en el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* en comparación con el tratamiento con *Streptomyces* sp. y el control. Estas diferencias posiblemente se deban a la capacidad de *A. chroococcum* de prevalecer en suelos ácidos, como el suelo propio de la rizósfera de *Cinchona* (Matsubara, 2013).

Apte & Shende (1981) mencionan que para incrementar el porcentaje de germinación de distintas especies vegetales en interacción con PGPRs es necesario evaluar el tipo de sustrato, temperatura, concentración de la cepa y compatibilidad con la especie vegetal. Estas variables probablemente no hallan estado en su nivel óptimo a fin de obtener un efecto positivo de los PGPRs sobre la germinación de *C. lancifolia* y *C. capuli* de tal forma que no mostraron diferencias significativas.

### **8.7.2 A nivel de plántulas**

#### **Porcentaje de plántulas**

La inoculación de las semillas con PGPRs viene siendo un método potencial para promover la emergencia satisfactoria y sobrevivencia de las plántulas. Un factor importante en la formación y sobrevivencia de las plántulas es la concentración de la cepa de PGPR que se le añade, Cancho (2016) menciona que una concentración de PGPR a  $10^9$  UFC/ml es elevado y genera mortandad de plántulas de *C. calisaya* y *C. krauseana*. En el presente estudio las cepas de PGPR inoculadas presentaron una concentración de  $10^8$  UFC/ml y en el tratamiento con *Azotobacter chroococcum* sobre las semillas de *C. capuli* lograron aumentar significativamente ( $p.value > 0.05$ ) en un 23.3% el porcentaje de plántulas formadas en comparación al control. Para *C. lancifolia* los tratamientos no presentaron diferencias significativas estadísticamente, incluso se obtuvo un menor porcentaje de plántulas formadas en el tratamiento con *Streptomyces sp.* Esto podría deberse al pH ácido del sustrato o a una falta de especificidad de esta cepa con las plántulas de *C. lancifolia*.

#### **Altura de las plántulas y longitud de las raíces**

En este trabajo la altura de las plántulas de *C. capuli* aumentó significativamente en el tratamiento con *A. chroococcum* + *Streptomyces sp.* por lo cual se podría inferir que la

asociación de estas cepas promueve el crecimiento de las plántulas como lo planteado por Harper & Lynch (1979). Para *C. lancifolia* la altura de las plántulas en los distintos tratamientos no presentaron diferencias significativas, pero hubo una tendencia ligera al incremento de la altura de las plántulas al ser tratadas con PGPRs. Probablemente este aumento podría haber sido significativo si se hubiera mantenido más tiempo de interacción con las PGPRs.

En la longitud de las raíces, todos los tratamientos con cepas de PGPRs aumentaron significativamente la longitud de la raíz tanto *C. capuli* como en *C. lancifolia*, esto confirmaría los resultados en distintos trabajos donde muestran que el efecto principal de las PGPRs es a nivel de las raíces, aumentando la biomasa radical estimulado por la formación de auxinas y fijando nitrógeno y fosfatos (Cooper, 1959).

### **Peso seco de las plántulas**

El peso seco es un buen estimador del carbono presente en las plantas, lo que permite interpretar aspectos importantes en su fisiología. El peso seco de las plántulas de *Cinchona* se evaluó a los 45 días después de iniciada la germinación. Las plántulas de *C. capuli* tratadas con *Azotobacter chroococcum* aumentaron significativamente el peso seco (1.47 mg/plántula) en comparación con el control (0.89 mg/plántula.), estos mismos resultados fueron obtenidos en los trabajos de Romero-Perdomo (2017) quien mostro que la inoculación con *Azotobacter chroococcum* influenció positivamente en el aumento de la biomasa vegetal de *Gossypium hirsutum*. Los demás tratamientos con PGPRs presentaron mayor peso seco que el control pero sin diferencias significativas, estos resultados podrían haber cambiado con mayor tiempo de exposición de la plántula en el sustrato con las cepas de PGPRs. En el caso de *C. lancifolia* el peso seco aumentó significativamente en las plántulas tratadas con *Streptomyces sp.*

## 9 CONCLUSIONES

- La viabilidad de las semillas de *Cinchona* depende directamente de la madurez del fruto en el momento de la colecta.
- Las semillas de *Cinchona* pierden viabilidad con el tiempo de almacenamiento.
- Las semillas de *C. capuli* L. Andersson mostraron un carácter ortodoxo, en cambio las semillas de *C. lancifolia* Mutis. presentan un carácter intermedio (no ortodoxo).
- Las cepas de PGPRs, *Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces sp.*, no influyen en el porcentaje de germinación de *Cinchona lancifolia* Mutis y *C. capuli* L. Andersson.
- Las cepas PGPRs, *Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces sp.*, incrementan la longitud de las raíces de plántulas de *C. capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis.
- Las cepas de PGPRs, *Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces sp.*, aumentan el peso seco de las plántulas de *C. capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis respectivamente.
- La interacción de *Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces sp.* mejoran la altura de las plántulas de *C. capuli*.

## 10 RECOMENDACIONES

- Es preferible realizar la colecta de frutos y semillas de *C. lancifolia* en el mes de agosto para esta zona, debido a que presentaron mayor viabilidad.
- Previo a la colecta de las semillas, establecer el tiempo de dispersión de las semillas, a fin de colectar semillas maduras.
- Los frutos colectados no deben mantenerse en lugares cerrados y húmedos debido a que son propensos a infecciones por hongos.
- Mantener a las semillas en sobres herméticos y a bajas temperaturas para evitar la pérdida de humedad y viabilidad.
- Evaluar la desinfección de las semillas con métodos que no afecten la interacción de las cepas en la germinación.
- Evaluar la interacción de PGPRs en un sustrato con mayor fuente orgánica.

## 11 BIBLIOGRAFIA

- Andersson, Lennart. 1998. "A revision of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae)". *Memoirs of the New York Botanical Garden* 80 (30 de enero). p. 2-3.
- Akbari, M., & Salehi, H. (2008). Physical dormancy and the best scarification treatment for flower of an hour (*Hibiscus trionum* L.) seeds. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 2(1), 27-31.
- Albán Joaquina (2013) *Etnobotánica de Rubiaceas Peruanas* (Tesis para optar el título de doctor en Ciencias Biológicas).
- Aldesuquy HS, Mansour FA, Abo-Hamed SA (1998) *Effect of the culture filtrates of Streptomyces on growth and productivity of wheat plants*. *Folia Microbiol* 43:465–470
- Apolo, M. (2012). *Germinación en laboratorio e influencia de los hongos micorrízicos y la aplicación de nutrientes en el crecimiento de dos procedencias de Cinchona pubescens, a nivel de invernadero*. Tesis de Grado. Carrera de Ingeniería Forestal. UNL. Loja, Ecuador. 78 pág.
- Aponte, R; y Sanmartin, J. (2011). *Fenología y ensayos de germinación de diez especies forestales nativas, con potencial productivo maderable y no maderable del bosque protector el bosque de la parroquia San Pedro de Vilcabamba, Loja*. Tesis de Ingeniería Forestal. Loja, Ecuador. 125 pág.
- Apte, R., & Shende, S. T. (1981). *Studies on Azotobacter chroococcum: II. Effect of Azotobacter chroococcum on germination of seeds of agricultural crops*.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Interamericana MacGraw Hill, 2da edición, Madrid, España.
- Bashan, Y., Levanony, H. (1990). *Current status of Azospirillum as a challenge of agriculture*. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 591-608.
- Berjak, P., & Pammenter, N. W. (2007). From *Avicennia* to *Zizania*: *seed recalcitrance in perspective*. *Annals of Botany*, 101(2), 213-228.



- Bewley, J.; Bradford K.; Hilhorst H.; Nonagaki H. (2013) *Seeds; Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd Edition. New York, NY: Springer New York. 392 p.
- Brown, E. & Walker, N. (1970). *Indol-3-acetic acid formation by Azotobacter chroococcurn*. Plant and Soil 32: 250-253.
- Buddenhagen, C. E., Renteria, J. L., Gardener, M., Wilkinson, S. R., Soria, M., YÁñez, P. & Valle, R. (2004). *The control of a highly invasive tree Cinchona pubescens in Galapagos*. Weed Technology, 18(sp1), 1194-1202.
- Camacho F. (1994) *Dormición de semillas, Causas y tratamientos*. Mexico, trillas, 27p.
- Campos Ruiz, J. (2014). *Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de Cinchona pubescens Vahl. "quina"*.
- Cancho Ccaico, S. (2017). *Condiciones que incrementan la germinación de semillas y el vigor de plantines de Cinchona krauseana L. Andersson y C. calisaya Wedd. (Rubiaceae)*. Tesis para optar el título profesional de Bióloga con mención en Botánica.
- Close, T. J. (1997). *Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature*. Physiologia Plantarum, 100(2), 291-296.
- Conde Montaña, M. E. (2016). *Propagación in vivo de Cinchona officinalis L., a partir de material vegetal sexual y asexual, con fines de conservación de la especie* (Bachelor's thesis, Loja: Universidad Nacional de Loja). pag. 60.
- Cooper, R. (1959). *Bacterial fertilizers in the Soviet Union*, Soils and Fertilizers 22, 327-333.
- Dawis M., Gardwood N. & Pritchard H. (2003). *Prediction of desiccation sensitivity in seeds of Woody species: a probabilistic model based on two seed traits and 104 species*. Annals of Botany. 2006, vol. 97: 667-674p.
- Delouche, J. C., Wayne Still, T., Raspet, M., & Lienhard, M. (1971). *Prueba de viabilidad de la semilla con Tetrazolium*.

- Dey R, Pal K., Bhatt D., Chauhan S. (2004). *Growth promotion and yield enhancement of peanut (Arachishypogaea L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria*. Microbiol. Res. 159: 371-394.
- Dibut, B. (1988). *Efecto de la aplicación de biofertilizantes a base de A. chroococcum sobre el cultivo de la cebolla*. Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, La Habana, 101 pp.
- Doumbou, C. L., Hamby Salove, M. K., Crawford, D. L., & Beaulieu, C. (2001). *Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth*. Phytoprotection, 82(3), 85-102.
- Dure, L. (1993). *A repeating 11-mer amino acidmotif and plantdesiccation*. ThePlantJournal, 3(3), 363-369.
- Echevarría, R. N (2011). *Estudios de rizobacterias promotoras del crecimiento (pgpr) como alternativa de aplicación a suelos con limitantes abióticas*.
- Espinosa, C. I., & Ríos, G. (2017). *Patrones de crecimiento de Cinchona officinalis in vitro y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas*. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas, 35(1-2), 73-82.
- Elias, S. & Garay A. (2004). *Tetrazolium test (TZ): A fast, reliable test to determinate seed viability*, Oregon State University seed Laboratory, Page\_Technical\_Brochures, USA
- Englert, J. (2007) *Simplified Guide to Understanding seed labels*. Maryland plant Materials Technical Note N°2 USDA-NRCS National plant material center, Beltsville, MD, EUA.
- García, F. P., & Villamil, J. M. P. (2001). *Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaria General de Estructuras.
- Garmendia, A. (2005). *El árbol de la quina (Cinchona spp), Distribución, caracterización de su Hábitat y arquitectura*, UTPL.

- Glick BR (1995). *The enhancement of plant growth by free-living bacteria*. Can. J. Microbiol. 41: 109-117.
- Gold K. & Hay F. (2008) *Identifying desiccation- sensitive seeds. Technical Information Sheet\_10*.
- Harper, S. H. T., & Lynch, J. M. (1979). *Effects of Azotobacter chroococcum on barley seed germination and seedling development*. Microbiology, 112(1), 45-51.
- Herman MAB, Nault BA, Smart CD (2008). *Effects of plant growth promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York*. CropProtect. 27: 996-1002.
- Hong, T. D., & Ellis, R. H. (1996). *A protocol to determine seed storage behaviour* (No.1). Bioversity International.
- ISTA 2005. *International Rules for Seed Testing*.
- Jeréz Bastidas, E. A. (2017). *Propagación sexual y asexual de la cascarilla (Cinchona officinalis L.), con fines de potencial reproductivo en el vivero Catiglata del Consejo provincial de Tungurahua* (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
- Jetiyanon, K., & Kloepper, J. W. (2002). *Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases*. Biological control, 24(3), 285-291.
- Jiménez, L., & Ramiro, N. (2016). *Procesos biotecnológicos para la propagación in vitro de Cinchona officinalis L., a partir de diferentes fuentes de materia vegetal* (Bachelor's thesis, Loja: Universidad Nacional de Loja).
- Kermode, A. R. (1995). *Regulatory Mechanisms in the Transition from Seed Development to Germination: Interactions Between the Embryo and the. Seed development and germination*, 41, 273.

- Kloepper JW, Rodriguez-Ubana R, Zehnder GW, Murphy JF, Sikora E, Fernandez C (1999). *Plant root bacterial interactions in biological control of soil borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases*. *Austr. Plant Pathol.* 28: 21-26.
- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S (2004). *Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus sp.* *Phytopathology*, 94: 1259-1266.
- Kumar, V., Behl, R. K., & Narula, N. (2001). *Establishment of phosphate-solubilizing strains of Azotobacter chroococcum in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions*. *Microbiological research*, 156(1), 87-93
- Lakshminarayana, K., Narula, N., Hooda, I. S., & Faroda, A. S. (1992). *Nitrogen economy in wheat (triticum-aestivum) through use of Azotobacter-chroococcum*. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 62(1), 75-76.
- Lalande R, Bissonnette N, Coutlée D, Antoun H (1989). *Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential*. *Plant Soil.* 115: 7-11.
- Maier, A., Riedlinger, J., Fiedler, H. & Hampp, R. (2004). *Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi dual culture*. *Mycological Progress* 3: 129-136.
- Martínez, R., Dibut, B., Casanova, I. & Ortega, M. (1997). *Acción estimuladora de Azotobacter chroococcum sobre el cultivo del tomate en suelos Ferralítico Rojo. I. Efecto sobre los semilleros*. *Agrotecnia de Cuba*. 27(1): 23-26
- Matsubara, A., & Hurtado, J. E. (2013). *Isolation and characterization of actinomycetes from acidic cultures of ores and concentrates*. In *Advanced Materials Research* (Vol. 825, pp. 406-409). Trans. Tech Publications.
- Mejía, D., Manzano, R., et al., (2012). *Agrobiotecnología fundamentos y aplicaciones, propagación comercial 312 especies de plantas por cultivo in vitro*. La Molina-Perú. p.79.

- Mejía Prieto F. (2014). *Factores que influyen en la germinación de semillas de 6 especies del género Cinchona (RUBIACEAE) en el Perú* (Tesis para optar el título profesional de Biólogo con mención en Botánica). Universidad Nacional San Marcos, Lima, Perú.
- Minorsky, P. V. (2008). On the inside. *Plant Physiology*. 146: 323-324.
- Moreno N. (1984). *Glosario Botánico Ilustrado*. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos bióticos, primera edición, impreso en Mexico.
- Moreno, C. P. (1996). *Vida y obra de granos y semillas*. La Ciencia Desde México. Secretaría de Educación, Pública, Fondo de Cultura Económica, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Nair P. . *Agroforestry species. Acrop sheet manual*. ICRAF. Nairobi, Kenya, 336p.
- Niembro, A. 1990. *Composición química de las semillas y su efecto en la conservación*. En seminario taller sobre la investigación de semillas forestales tropicales.
- Okon, Y., Lavandera, C. 1994. Agronomic Applications of Azospirillum: *An evaluation of 20 years world wide field inoculation*. Soil Biology & Biochemistry 26: 1591- 1601
- Pammeenter N. & Berjak P. (1999) *A review of recalcitrant seed physiology in relatio to desiccation tolerance mechanisms*. Seed Science Research, vol. 9, p.13 – 37.
- Pritchard H. & Manger K. (1998). *A calorimetric perpective on desiccation stress during preservation procederus with recalcitrant sedds Quercus robur L. Cryo-Letters*. Vol.19, nº1, p.23-30.
- Popiniguis, F. (1985). *Fisilogia da semente*. 2 ed. Brasilia. 289 p.
- Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M. E., & Ghosh, K. (2007). *Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma (Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8)*. Bioversity International.
- Roberts, E. H. (1972). Dormancy: a factor affecting seed survival in the soil. *In Viability of seeds* (pp. 321-359). Springer, Dordrecht.

- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de microbiología*, 49(4), 377-383.
- Rothrock, C. & Gottlieb, D. (1981). *Importance of antibiotics production un antagonism of selected Streptomyces especies to two soil-borne plant pathogens*. *The Journal of Antibiotics* 34: 830-835.
- SENAMHI (2017) Boletín meteorológico e hidrológico del Perú. Disponible en: [https://senamhi.gob.pe/include\\_mapas/\\_dat\\_esta\\_tipo.php?estaciones=472606FA](https://senamhi.gob.pe/include_mapas/_dat_esta_tipo.php?estaciones=472606FA)
- Stell G. (1982). *Flores para el Rey*. Editorial del Serbal. Barcelona-España. 347 pp.
- Suneja, S., Lakshminarayana, K., & Narula, N. (1994). *Optimization of cultural conditions for hydroxamate type of siderophore production by Azotobacter chroococcum*. *Microbiological research*, 149(4), 385-390.
- Tokala, K., Strap, C., Jung, D., Crawford, L., Salove, L., Deobald, F., Bailey, J. & Morra, J. (2002). *Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving Streptomyces lydicus WYEC108 and the pea plant (Pisum sativum)*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2161-2171.
- Vancura, I. (1961). *Detection of gibberellic acid in Azotobacter Cultures*. *Nature*. 192. p. 89-90.

## 12 ILUSTRACIONES

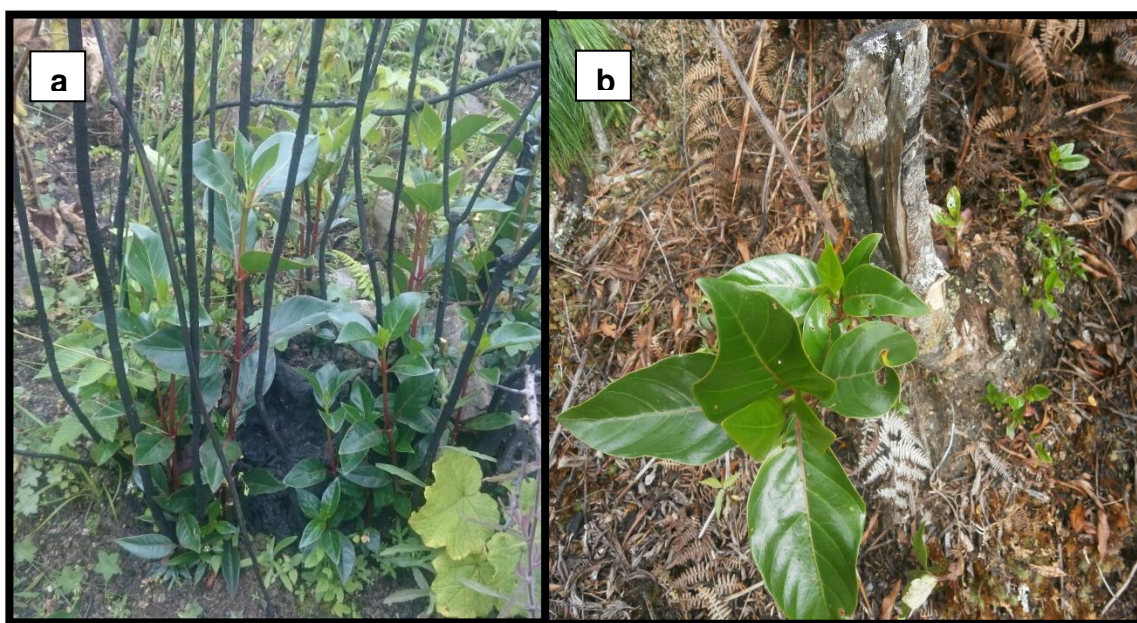


**Figura 29.** Colecta de ramas de frutos de *Cinchona* en la localidad de Cataluco, distrito y provincia de Huancabamba, departamento de Piura.



**Figura 30.** Rama en fructificación de *Cinchona capuli* donde se observa frutos en formación e inmaduros.





**Figura 31.** Regeneración de *Cinchona*; Emergencia de ramas a partir de una planta quemada (a) y a partir de una planta talada (b).



**Figura 32.** Frutos de *Cinchona* agrupados de acuerdo a su maduración: 1. Frutos verdes inmaduros, 2. Frutos rojizos inmaduros, 3. Frutos marrones maduros, 4. Frutos marrones oscuro, maduros y en dehiscencia

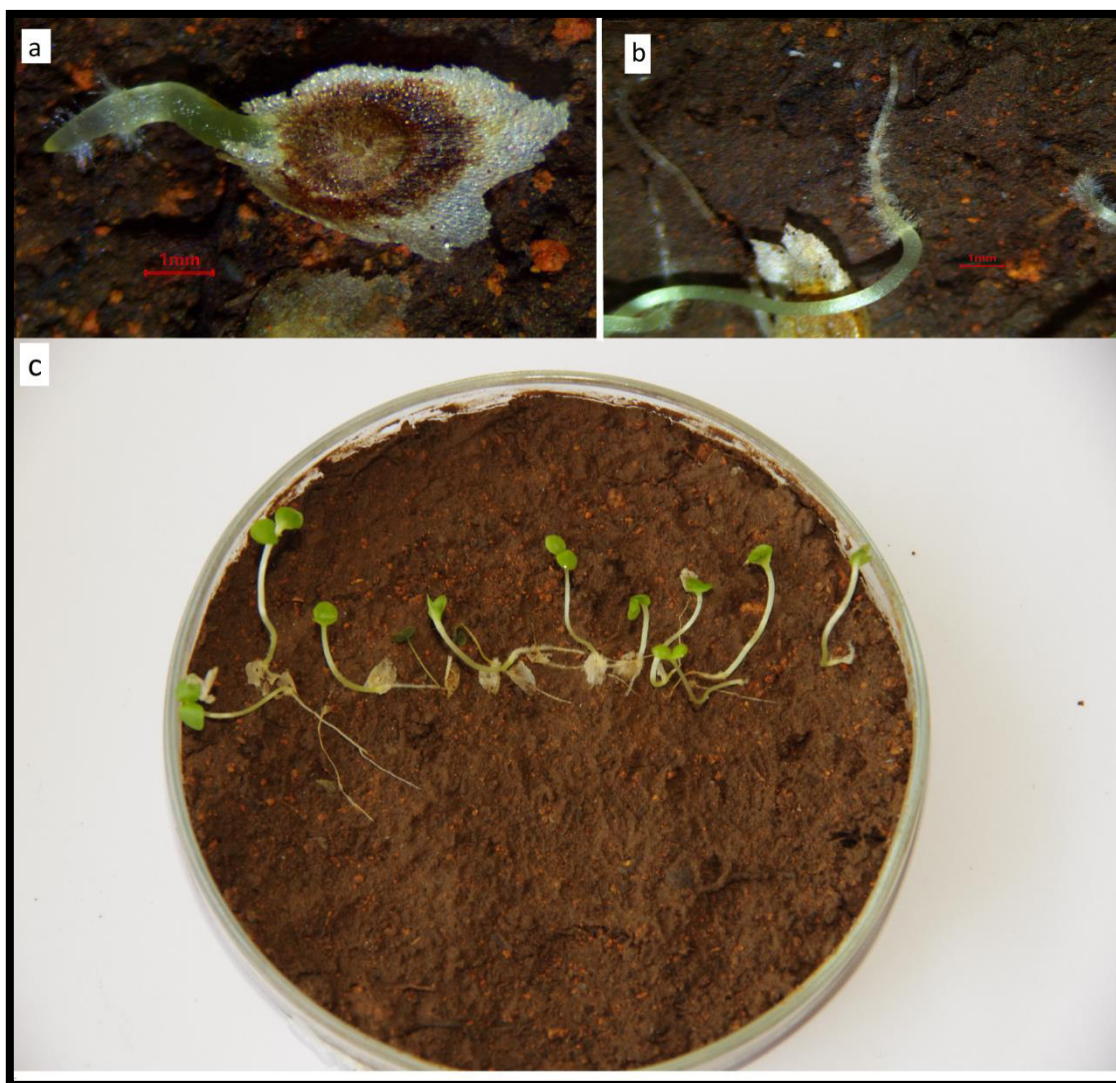




**Figura 33.** Inoculación de cepa de PGPR sobre el sustrato y semillas de *C. lancifolia* y *C. capui*



**Figura 34.** Placas Petri con semillas de *Cinchona* sembradas en sustrato suelo de *Cinchona* e inoculadas con PGPRs



**Figura 35.** *C. lancifolia*; **a**= Germinación, radícula emergiendo; **b**= Formación de raíz; **c**= Placa Petri con plántulas.

## 13 ANEXOS

**Anexo 1.** Peso de 100 semillas de *Cinchona lancifolia* y *C. capuli*. Análisis de Varianza del peso de las semillas. Comparación de Tukey para ambas especies

ESPECIE	Variable	n	Media	D.E.	MínMáx
<i>C. capuli</i>	peso de 100 semillas (g)	7	0.053	0.004	0.048 0.060
<i>C. lancifolia</i>	peso de 100 semillas (g)	7	0.087	0.005	0.076 0.091

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
peso de 100 semillas (g)	14	0.94	0.93	6.56

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.8E-03	1	3.8E-03	181.77	<0.0001
ESPECIE	3.8E-03	1	3.8E-03	181.77	<0.0001
Error	2.5E-04	12	2.1E-05		
Total	4.1E-03	13			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00535**  
 Error: 0.0000 gl: 12

ESPECIE	Medias	n	E.E.
<i>C. capuli</i>	0.05	7	1.7E-03 A
<i>C. lancifolia</i>	0.09	7	1.7E-03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 2.** Análisis de Varianza del largo y ancho del endospermo de las semillas de *C. lancifolia* y *C. capuli*. Comparación de Tukey para ambas especies.

especie	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
c.capuli	largo (mm)	100	2.14	0.29	1.43	2.92
c.lancifolia	largo (mm)	100	2.53	0.32	1.82	3.20
c.capuli	ancho (mm)	100	1.39	0.20	1.01	1.94
c.lancifolia	ancho (mm)	100	1.69	0.23	1.13	2.29

**Análisis de la varianza**

**Largo (mm)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
largo (mm)	200	0.29	0.29	13.08	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.64	1	7.64	81.78	<0.0001
especie	7.64	1	7.64	81.78	<0.0001
Error	18.51	198	0.09		
Total	26.15	199			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.08485**

Error: 0.0935 gl: 198

especie	Medias	n	E.E.
c.capuli	2.14	100	0.03
c.lancifolia	2.53	100	0.03

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Ancho (mm)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
ancho (mm)	200	0.32	0.31	14.11	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4.36	1	4.36	92.15	<0.0001
especie	4.36	1	4.36	92.15	<0.0001
Error	9.37	198	0.05		
Total	13.73	199			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.06037**

Error: 0.0473 gl: 198

especie	Medias	n	E.E.
c.capuli	1.39	100	0.02
c.lancifolia	1.69	100	0.02

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 3.** Contenido de humedad de las semillas para *Cinchona capuli* y *C. lancifolia*, indicando el peso antes y después del secado.

Lote	Especie	Fecha de Colecta	Fecha de análisis	Re p.	Peso placa metal (recipiente)	Peso Recipiente + semillas	Peso seco	Contenido de Humedad %
1	<i>C. capuli</i>	Jun-2016	Ago-16	1	10.173	10.280	10.269	10.28
1	<i>C. capuli</i>	Jun-2016	Ago-16	2	10.136	10.253	10.239	11.97
1	<i>C. capuli</i>	Jun-2016	Ago-16	3	10.218	10.322	10.312	9.62
2	<i>C.lancifolia</i>	Jun-2016	Ago-16	1	10.062	10.161	10.149	11.75
2	<i>C.lancifolia</i>	Jun-2016	Ago-16	2	10.280	10.381	10.369	11.79
2	<i>C.lancifolia</i>	Jun-2016	Ago-16	3	10.123	10.218	10.205	13.68
3	<i>C.lancifolia</i>	Ago-2017	Ago-17	1	10.313	10.414	10.403	10.89
3	<i>C.lancifolia</i>	Ago-2017	Ago-17	2	10.231	10.346	10.336	8.70
3	<i>C.lancifolia</i>	Ago-2017	Ago-17	3	10.445	10.548	10.538	9.71

**Anexo 4.** Datos de la Viabilidad de las semillas para *C. capuli* y *C. lancifolia* realizada en Junio del 2016 y Agosto del 2017

Lote	Especie	Fecha de Colecta	Fecha de Análisis	rep	Total semillas	Embrión teñido	Embrión sin teñir	% viabilidad	Promedio Viabilidad
1	<i>C.capuli</i>	Jun-16	Jul-16	1	30	28	2	93.33	88.91
1	<i>C.capuli</i>	Jun-16	Jul-16	2	32	29	3	90.63	
1	<i>C.capuli</i>	Jun-16	Jul-16	3	29	24	5	82.76	
1	<i>C.capuli</i>	Jun-16	Ago-17	1	30	18	12	60.00	57.78
1	<i>C.capuli</i>	Jun-16	Ago-17	2	30	19	11	63.33	
1	<i>C.capuli</i>	Jun-16	Ago-17	3	30	15	15	50.00	
2	<i>C.lancifolia</i>	Jun-16	Jul-16	1	30	17	13	56.67	48.89
2	<i>C.lancifolia</i>	Jun-16	Jul-16	2	30	15	15	50.00	
2	<i>C.lancifolia</i>	Jun-16	Jul-16	3	30	12	18	40.00	
3	<i>C.lancifolia</i>	Ago-17	Ago-17	1	30	27	3	90.00	81.11
3	<i>C.lancifolia</i>	Ago-17	Ago-17	2	30	24	6	80.00	
3	<i>C.lancifolia</i>	Ago-17	Ago-17	3	30	22	8	73.33	

**Anexo 5.** Análisis de Varianza de la viabilidad de las semillas de *C. lancifolia* y *C. capuli* en dos fechas de evaluaciones.

Especie	Fecha de Colecta	Fecha de Analisis	Variable	n	Media	D.E.
C.capuli	Jun-16	Ago-17	Viabilidad	3	57.78	6.94
C.capuli	Jun-16	Jul-16	Viabilidad	3	88.91	5.49
C.lancifolia	Ago-17	Ago-17	Viabilidad	3	81.11	8.39
C.lancifolia	Jun-16	Jul-16	Viabilidad	3	48.89	8.39

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% Viabilidad	12	0.88	0.84	10.70

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3219.56	3	1073.19	19.59	0.0005
Especie	3219.56	3	1073.19	19.59	0.0005
Error	438.16	8	54.77		
Total	3657.72	11			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=19.35065**  
Error: 54.7702 gl: 8

Especie	Fecha de análisis	Medias	n	E.E.
C.lancifolia	2016 Jul-16	48.89	3	4.27 A
C.lancifolia	2017 Ago-17	81.11	3	4.27 B
C.capuli	Jul-16	88.91	3	4.27 B
C.capuli *	Ago-17	57.78	3	4.27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 6.** Porcentaje de germinación en el tiempo de Cinchona en dos contenidos de humedad distintos.

Lote	Especie	Fecha de colecta	Contenido de humedad	Semillas Totales	Días después de sembrado	Semillas germinadas	Porcentaje de Germinación
1	<i>C. capuli</i>	Jun-16	5%	40	11	0.67	1.67
1	<i>C. capuli</i>	Jun-16	5%	40	16	16.67	41.67
1	<i>C. capuli</i>	Jun-16	5%	40	21	21.00	52.50
1	<i>C. capuli</i>	Jun-16	5%	40	26	22.33	55.83
1	<i>C. capuli</i>	Jun-16	8%	40	11	4.33	10.83
1	<i>C. capuli</i>	Jun-16	8%	40	16	17.67	44.17
1	<i>C. capuli</i>	Jun-16	8%	40	21	19.00	47.50
1	<i>C. capuli</i>	Jun-16	8%	40	26	19.00	47.50
2	<i>C. lancifolia</i>	Jun-16	5%	40	11	0.00	0.00
2	<i>C. lancifolia</i>	Jun-16	5%	40	16	0.00	0.00
2	<i>C. lancifolia</i>	Jun-16	5%	40	21	0.00	0.00
2	<i>C. lancifolia</i>	Jun-16	5%	40	26	0.00	0.00
2	<i>C. lancifolia</i>	Jun-16	8%	40	11	0.00	0.00
2	<i>C. lancifolia</i>	Jun-16	8%	40	16	9.00	22.50
2	<i>C. lancifolia</i>	Jun-16	8%	40	21	10.33	25.83
2	<i>C. lancifolia</i>	Jun-17	8%	40	26	11.00	27.50

**Anexo 7.** Análisis de varianza en los porcentajes de germinación de *C. capuli* y *C. lancifolia* en dos contenidos de humedad (5% y 8%).

**Medidas resumen**

especie	% hum	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
C.capuli	5.00	porcent	3	55.83	20.21	32.50	67.50
C.capuli	8.00	porcent	3	47.50	11.46	35.00	57.50
C.lancifolia	5.00	porcent	3	0.00	0.00	0.00	0.00
C.lancifolia	8.00	porcent	3	27.50	6.61	22.50	35.00

**Análisis de la varianza C. capuli**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
porcent	6	0.09	0.00	31.79

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	104.17	1	104.17	0.39	0.5680
especie	0.00	0	0.00	sdsd	
% hum	104.17	1	104.17	0.39	0.5680
Error	1079.17	4	269.79		
Total	1183.33	5			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=37.23571**

Error: 269.7917 gl: 4

% hum	Medias	n	E.E.
5.00	55.83	3	9.48 A
8.00	47.50	3	9.48 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Análisis de la varianza C. lancifolia**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
porcent	6	0.93	0.91	34.02

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1134.38	1	1134.38	51.86	0.0020
especie	0.00	0	0.00	sdsd	
% hum	1134.38	1	1134.38	51.86	0.0020
Error	87.50	4	21.88		
Total	1221.88	5			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=10.60277**

Error: 21.8750 gl: 4

% hum	Medias	n	E.E.
8.00	27.50	3	2.70 A
5.00	0.00	3	2.70 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo 8.** Medidas de Resumen y Análisis de varianza en la Germinación de *Cinchona capuli* y *C. lancifolia* en los distintos tratamientos

**Medidas resumen**

ESPECIE	TRAt.	Variable	n	Media	D.E.	MínMáx
<i>C. capuli</i> A. chroococcum + Streptom..	%germin.	4	0.60	0.12	0.47	0.73
<i>C. capuli</i> Azotobacter chroococcum	%germin.	4	0.72	0.18	0.53	0.93
<i>C. capuli</i> control	%germin.	4	0.50	0.13	0.33	0.60
<i>C. capuli</i> Streptomyces sp.	%germin.	4	0.62	0.06	0.53	0.67
<i>C. lancifolia</i> A. chroococcum + Streptomy..	%germin.	4	0.92	0.03	0.87	0.93
<i>C. lancifolia</i> Azotobacter chroococcum	%germin.	4	0.90	0.09	0.80	1.00
<i>C. lancifolia</i> control	%germin.	4	0.87	0.05	0.80	0.93
<i>C. lancifolia</i> Streptomyces sp.	% germin.	4	0.90	0.16	0.67	1.00

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% germinación	32	0.67	0.61	15.44

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.73	5	0.15	10.79	<0.0001
ESPECIE	0.66	1	0.66	49.08	<0.0001
TRAt.	0.07	4	0.02	1.22	0.3251
Error	0.35	26	0.01		
Total	1.08	31			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.08436**

Error: 0.0135 gl: 26

ESPECIE	Medias	n	E.E.
<i>C. lancifolia</i>	0.90	16	0.03 A
<i>C. capuli</i>	0.61	16	0.03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



**Anexo 9.**Índicede Velocidad de Germinación de *C. capuli* en los distintos tratamientos con PGPRs y control.

Tratamiento	ni (semillas de <i>C. capuli</i> germinadas)	ti (tiempo de germinación)	ni/ti	Índice de Velocidad de germinación
				$\Sigma(ni/ti)$
<i>Azotobacter chroococcum</i>	8	14	0.5714	2.191225
	10.5	21	0.5000	
	10.75	29	0.3707	
	10.75	35	0.3071	
	10.75	43	0.2500	
	10.75	56	0.1920	
<i>Streptomyces sp.</i>	6.75	14	0.4821	1.797495
	7.75	21	0.3690	
	8.75	29	0.3017	
	9.25	35	0.2643	
	9.25	43	0.2151	
	9.25	56	0.1652	
<i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces sp.</i>	6.5	14	0.4643	1.709687
	7.25	21	0.3452	
	8.5	29	0.2931	
	8.5	35	0.2429	
	8.75	43	0.2035	
	9	56	0.1607	
control	5.5	14	0.3929	1.507444
	7	21	0.3333	
	7.5	29	0.2586	
	7.5	35	0.2143	
	7.5	43	0.1744	
	7.5	56	0.1339	

**Anexo 10.** Índice de Velocidad de Germinación de *C. lancifolia* en los distintos tratamientos con PGPRs y control

Tratamiento	ni (semillas de <i>C. lancifolia</i> germinadas)	ti (tiempo de germinación)	ni/ti	Velocidad de germinación
				$\Sigma(ni/ti)$
Control	6.5	14	0.4643	2.237588
	10.25	21	0.4881	
	11	29	0.3793	
	13	35	0.3714	
	13	43	0.3023	
	13	56	0.2321	
<i>Azotobacter chroococcum</i>	5.25	14	0.3750	2.021922
	9.25	21	0.4405	
	10.75	29	0.3707	
	11.25	35	0.3214	
	11.75	43	0.2733	
	13.5	56	0.2411	
<i>Streptomyces</i> sp.	3.75	14	0.2679	1.751576
	7	21	0.3333	
	9.5	29	0.3276	
	11	35	0.3143	
	11.5	43	0.2674	
	13.5	56	0.2411	
<i>A. chroococcum</i> + <i>Streptomyces</i>	1	14	0.0714	1.206440
	3.5	21	0.1667	
	6.5	29	0.2241	
	8.5	35	0.2429	
	11	43	0.2558	
	13.75	56	0.2455	

**Anexo 11.** Análisis de Varianza realiza al porcentaje de plántulas en los distintos tratamientos para *C. capuli* y *C. lancifolia*.

**% plántulas *C. capuli***

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% plantulas	16	0.47	0.34	19.95

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.11	3	0.04	3.57	0.0472
tratamiento	0.11	3	0.04	3.57	0.0472
Error	0.13	12	0.01		
Total	0.24	15			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.21464**

Error: 0.0105 gl: 12

tratamiento	Medias	n	E.E.				
control			0.38	4	0.05	A	
<i>Streptomyces sp.</i>	0.52	4	0.05	A		B	
<i>A. chroococcum</i> + <i>Streptom.</i>	0.53	4	0.05	A		B	
<i>Azotobacter chroococcum</i>	0.62	4	0.05			B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0.05)

**% plántulas *C. lancifolia***

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% plantulas	16	0.18	0.00	38.41

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.10	3	0.03	0.90	0.4705
TRAt.	0.10	3	0.03	0.90	0.4705
Error	0.45	12	0.04		
Total	0.55	15			

**Anexo 12.**Prueba de Kruskal Wallis, realizada a la altura de las plántulas formadas en los distintos tratamientos para *C. capuli* y *C. lancifolia*.

**Prueba de Kruskal Wallis**

***C. capuli***

Variable	tratamiento	N	Medias	D.E.	rangos	H	p
Altura de las plantulas	A. chroococcus + Strepomyc..	20	2.11	0.58	55.18	14.26	0.0026
Altura de las plantulas	Azotobacter chroococcum	20	1.81	0.85	39.65		
Altura de las plantulas	control	20	1.41	0.41	27.53		
Altura de las plantulas	Streptomyces sp.	20	1.81	0.85	39.65		

Trat.	Medias	Ranks	
control	1.41	27.53	A
Streptomyces sp.	1.81	39.65	A
Azotobacter chroococcum	1.81	39.65	A
A. chroococcus + Strepomyc..	2.11	55.18	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Prueba de Kruskal Wallis**

***C. lancifolia***

Variable	tratamiento	N	Medias	D.E.	rangos	H	p
Altura de las plantulas	A. chroococcus + Strepomyc..	20	1.76	0.40	40.23	3.82	0.2809
Altura de las plantulas	Azotobacter chroococcum	20	1.90	0.42	48.30		
Altura de las plantulas	control	20	1.63	0.24	34.10		
Altura de las plantulas	Streptomyces sp.	20	1.70	0.35	39.38		

**Anexo 13. . Prueba de Kruskal Wallis, realizada a la longitud de la raíz de las plántulas formadas en los distintos tratamientos para *C. capuli* y *C. lancifolia*.**

**Prueba de Kruskal Wallis**

***C. capuli***

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	H	p
Long. Raiz A. chroococcum + Streptomyc..		20	0.89	0.29	16.88	0.0007
Long. Raiz Azotobacter chroococcum		20	0.93	0.67		
Long. Raiz control		20	0.60	0.27		
Long. Raiz Streptomyces sp.		20	0.74	0.19		

**Trat. Medias Ranks**

control	0.60	24.03	A
Azotobacter chroococcum	0.93	41.50	B
Streptomyces sp.	0.74	42.60	B
A. chroococcus + Streptomyc..	0.89	53.88	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)*

**Prueba de Kruskal Wallis**

***C. lancifolia***

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	H	p
LongitudRaiz A. chroococcum + Streptomyc..		20	1.46	0.58	8.35	0.0391
LongitudRaiz Azotobacter chroococcum		20	1.37	0.49		
LongitudRaiz control		20	1.05	0.45		
LongitudRaiz Streptomyces sp.		20	1.30	0.46		

**Trat. Medias Ranks**

control	1.05	27.75	A
Streptomyces sp.	1.30	42.58	B
Azotobacter chroococcum	1.37	44.98	B
A. chroococcus + Streptomyc..	1.46	46.70	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)*

**Anexo 14. Análisis de varianza realizado al peso seco de las plántulas de *C. capuli* y *C. lancifolia* en los distintos tratamientos**

**Análisis de la varianza**

**Peso seco de *C. capuli***

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
peso seco	16	0.66	0.58	23.05

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9.2E-06	3	3.1E-06	7.82	0.0037
tratamiento	9.2E-06	3	3.1E-06	7.82	0.0037
Error	4.7E-06	12	3.9E-07		
Total	1.4E-05	15			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00132**

Error: 0.0000 gl: 12

tratamiento	Medias	n	E.E.			
control		1.7E-03	4	3.1E-04	A	
A. chroococcus + Strepomyc..		2.6E-03	4	3.1E-04	A	B
Streptomyces sp.		2.9E-03	4	3.1E-04	A	B
Azotobacter chroococcum		3.8E-03	4	3.1E-04		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Análisis de la varianza**

**Peso seco de *C. lancifolia***

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
peso seco	16	0.50	0.37	22.83

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8.0E-06	3	2.7E-06	4.00	0.0346
tratamiento	8.0E-06	3	2.7E-06	4.00	0.0346
Error	8.0E-06	12	6.6E-07		
Total	1.6E-05	15			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00171**

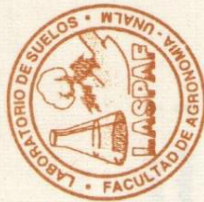
Error: 0.0000 gl: 12

tratamiento	Medias	n	E.E.			
control		2.7E-03	4	4.1E-04	A	
Azotobacter chroococcum		3.1E-03	4	4.1E-04	A	B
A. chroococcus + Strepomyc..		4.1E-03	4	4.1E-04	A	B
Streptomyces sp.		4.4E-03	4	4.1E-04		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



Anexo 15. Análisis del suelo: Caracterización del suelo de Cinchona lancifolia



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS

LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES

ANALISIS DE SUELOS : CARACTERIZACION

Solicitante : UNMSM

Departamento : PIURA

Distrito :

Referencia : H.R. 61364-153C-17

Fact.: 1774

Provincia : HUANCABAMBA

Predio :

Fecha : 20/11/17

Número de Muestra		pH ( 1:1 )	C.E. (1:1) dS/m	CaCO <sub>3</sub> %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cationes Cambiables meq/100g				Suma de Cationes Bases	Suma de Sat. De Bases %		
Lab	Claves							Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>			Al <sup>+3</sup> + H <sup>+</sup>	
13110	Cataluco	4.48	0.31	0.00	10.59	2.5	179	59	22	19	Fr.A.	33.92	3.57	1.57	0.35	0.07	2.70	8.26	5.56	16

A = Arena ; A.Fr. = Arena Franca ; Fr.A. = Franco Arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = Franco Limoso ; L = Limoso ; Fr.Ar.A. = Franco Arcillo Arenoso ; Fr.Ar. = Franco Arcilloso ; Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = Arcillo Limoso ; Ar. = Arcilloso

Dr. Sady García Bendejón  
Jefe del Laboratorio